

Entwicklung eines Twinribozyms für die RNA-Reparatur

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Rüdiger Welz

geboren am 08.06.1971 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Linscheidt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Sabine Müller
2. Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz
3. Prof. Dr. Jürgen Liebscher

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2003

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Einleitung | 1 |
| 1 Twinribozyme – Hintergrund und Konzeption der Arbeit | 4 |
| 1.1 Ribozym-basierte gentherapeutische Ansätze | 4 |
| 1.2 Das Hairpinribozym | 7 |
| 1.3 Twinribozyme für die RNA-Reparatur | 16 |
| 2 Synthese der Ribozyme und Substrate | 18 |
| 2.1 Chemische RNA-Synthese | 18 |
| 2.1.1 Das Standard-Phosphoramidit-Verfahren | 18 |
| 2.1.2 Synthese von 5-(Benzylmercapto)-1 <i>H</i> -tetrazol (BMT) | 21 |
| 2.1.3 Ergebnisse der RNA-Synthese mit BMT als Aktivator | 24 |
| 2.1.4 Reinigung der Oligoribonukleotide | 27 |
| 2.2 Enzymatische RNA-Synthese | 28 |
| 2.2.1 Synthese der DNA-Einzel- und Doppelstränge | 29 |
| 2.2.2 <i>In vitro</i> Transkription mit T7-RNA-Polymerase | 31 |
| 3 Analytik der ribozymkatalysierten Reaktionen | 33 |
| 3.1 Der Assay zur Detektion fluoreszeinmarkierter RNAs | 33 |
| 3.1.1 Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren | 33 |
| 3.1.2 Quantitative Analyse mit einem DNA-Sequenzierautomaten | 34 |
| 3.2 Kinetische Charakterisierung der Ribozymreaktionen | 37 |
| 4 Design der Einzelmotive für ein tandemkonfiguriertes Twinribozym | 40 |
| 4.1 RNAs mit <i>three-way junction</i> | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | Untersuchungen zur Spaltaktivität von Hairpinribozymen mit <i>three-way junction</i> | 41 |
| 4.3 | Ligationseigenschaften der <i>three-way junction</i> Ribozyme | 45 |
| 4.3.1 | Untersuchung der Re-Ligation von Fragmenten aus Spaltreaktionen | 46 |
| 4.3.2 | Ligationsverhalten des HP-TJ ₃ -Ribozyms | 48 |
| 4.3.3 | Versuche zur Bestimmung kinetischer Konstanten für die Ligation | 51 |
| 4.3.4 | Cross-Ligation: Fragmentaustausch nach Spaltung durch HP-TJ ₃ | 53 |
| 4.4 | Untersuchung von Hairpinribozymvarianten | 55 |
| 4.4.1 | Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne | 55 |
| 4.4.2 | Verbesserung der Akzeptanz von Spermin als Kofaktor | 59 |
| 5 | Synthese doppeltsplattender Twinribozyme | 67 |
| 5.1 | Enzymatische Synthese – Erster Versuch | 67 |
| 5.2 | Chemische Synthese eines Twinribozyms | 69 |
| 5.2.1 | Synthese und Reinigung einer 141-mer RNA | 69 |
| 5.2.2 | Spaltaktivität des Syntheseprodukts | 73 |
| 5.3 | Enzymatische Synthese – Zweiter Versuch | 76 |
| 5.3.1 | Abwandlung der Einzelmotive für die Transkription | 76 |
| 5.3.2 | Enzymatische Synthese von HP-TW5 | 78 |
| 5.3.3 | Doppelsplattaktivität des Twinribozyms HP-TW5 | 79 |
| 6 | RNA-Reparatur durch ein Twinribozym | 81 |
| 6.1 | Konzept für den RNA-Fragmentaustausch durch HP-TW5 | 81 |
| 6.2 | RNA-Reparatur durch HP-TW5 | 85 |
| 6.3 | Analytischer Nachweis des Reparaturprodukts | 88 |
| 6.4 | Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen | 91 |
| 7 | Experimenteller Teil | 92 |
| 7.1 | Materialien | 92 |
| 7.1.1 | Labor- und Feinchemikalien | 92 |
| 7.1.2 | Enzyme | 92 |
| 7.1.3 | Trennmaterialien | 92 |
| 7.1.4 | Geräte | 93 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 7.2 | Arbeitsvorschriften | 93 |
| 7.2.1 | Chemische RNA-Synthese und Reinigung | 93 |
| 7.2.2 | Chemische DNA-Synthese und Reinigung | 99 |
| 7.2.3 | Enzymatische RNA-Synthese | 100 |
| 7.2.4 | Weitere Methoden zur Reinigung und Isolierung von Oligonukleotiden | 105 |
| 7.2.5 | Analyse der Ribozymreaktionen am A.L.F.-Sequenzierautomaten | 108 |
| 7.2.6 | Spaltreaktionen | 109 |
| 7.2.7 | Synthese von RNA-Fragmenten mit 2',3'-Cyclophosphat | 113 |
| 7.2.8 | Ligationsreaktionen | 114 |
| 7.2.9 | RNA-Reparaturreaktionen | 118 |
| 8 | Zusammenfassung | 120 |
| | Literaturverzeichnis | 124 |
| | Anhang | 131 |
| | Abbildungsverzeichnis | 134 |
| | Tabellenverzeichnis | 138 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| 3WJ | <i>three-way junction</i> |
| A | Adenosin |
| Ac | Acetyl |
| A.L.F. | <i>Automated Laser Fluorescence</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytidin |
| cDNA | <i>copy</i> DNA |
| CPG | <i>Controlled Pore Glass</i> |
| dA, dC, dG | 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxyguanosin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMTr | 4,4'-Dimethoxytrityl |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| ds | <i>double strand(ed)</i> |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDTA | Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure |
| Φ | Fluoreszein-Marker |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| G | Guanosin |
| HDTMAB | Hexadecyltrimethylammoniumbromid |
| HDV | <i>Hepatitis Delta</i> Virus |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency</i> Virus |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IGS | <i>Internal Guide Sequence</i> |
| lcaa | <i>long chain aminoalkyl</i> |
| mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| nt | Nukleotide |
| NTPs | Ribonukleosidtriphosphate |

| | |
|-------|--|
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| ss | <i>single strand(ed)</i> |
| sTRSV | <i>Tobacco Ringspot Virus-Satelliten-RNA</i> |
| T | Thymin |
| TBDMS | <i>t</i> -Butyldimethylsilyl |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| tRNA | <i>transfer</i> RNA |
| U | Uridin |

Nomenklatur der Ribozyme

| Name | Erklärung | Struktur |
|-----------------------|--|----------------|
| HP-WT | dreisträngige Minimalform des H airpinribozyms mit W ildtypsequenz | Abb. 5, S. 10 |
| HP-WTL | zweisträngige Form, bei der Helix 4 durch einen L oop aus 3 ungepaarten Nukleotiden abgeschlossen ist | Abb. 36, S. 61 |
| HP-WTTL | wie HP-WTL, aber Abschluss der Helix 4 durch einen T etra-loop (aus 4 ungepaarten Nukleotiden) | Abb. 36, S. 61 |
| HP-WTLH4 HP-WTTLH4 | wie HP-WTL/WTTL, aber H elix 4 wurde von 3 auf 6 bp verlängert | Abb. 36, S. 61 |
| HP-SV1 * | Auf HP-WTL basierende Hairpinribozyme mit Sequenzveränderung in der Substratbindungsdomäne (fortlaufende Nummerierung) | Abb. 32, S. 56 |
| HP-TJ _n * | <i>three-way junction</i> Ribozyme mit n ungepaarten Nukleotiden zwischen Helix 3 und Helix 5 | Abb. 25, S. 42 |
| HP-TW1 | T winribozyme aus zwei Hairpin-Motiven (fortlaufende Nummerierung) | Abb. 39, S. 68 |

* Die Namen dieser Ribozyme wurden durch weitere Strukturangaben (z. B. TL oder H4) zusätzlich differenziert.

Die Sekundärstrukturen der wichtigsten der in dieser Arbeit untersuchten Ribozyme im Komplex mit zugehörigen Substraten sind im Anhang (ausklappbar) zusammengestellt.

Einleitung

Die Entscheidung einer der bekanntesten naturwissenschaftlichen Zeitschriften, *Science*, RNA zum „Molekül des Jahres 2002“ zu küren (COUZIN 2002), lässt auf den großen Erkenntniszuwachs über die Bedeutung dieses Moleküls in den letzten Jahren schließen. Lange Zeit für den simplen Transporter der Erbinformation von der DNA im Zellkern zu den Ribosomen (den Zentren der Proteinbiosynthese) gehalten, musste das Bild des passiven Datenüberträgers spätestens mit der Entdeckung der Ribozyme revidiert werden (CECH *et al.* 1981, GUERRIER-TAKADA *et al.* 1983, Nobelpreis für Cech und Altman 1989). Bei Ribozymen handelt es sich um eine Klasse katalytisch aktiver RNA-Moleküle, deren natürlich vorkommende Vertreter eine wichtige Rolle bei der (Selbst-) Prozessierung viraler und bakterieller RNA spielen, indem sie die reversible Spaltung von Phosphorsäureesterbindungen in Ribonukleinsäuren katalysieren.

Die weiteren Entdeckungen und Entwicklungen der letzten 10 Jahre auf dem Gebiet der molekularen Biologie und Chemie revolutionierten das Bild des chemischen und des funktionellen Potentials von Nukleinsäuren jedoch noch umfassender. So wurden sowohl durch rationales Design als auch durch kombinatorische Ansätze neue synthetische Ribozyme gewonnen, die in der Lage sind, verschiedenste Reaktionen zu katalysieren: Die Knüpfung und Spaltung von Phosphodiester- und Thiophosphatbindungen (BARTEL und SZOSTAK 1993, LORSCH und SZOSTAK 1994, EKLAND *et al.* 1995), Aminoacylierungen (LOHSE und SZOSTAK 1996), Amid- und Peptidbindungsknüpfungen (WIEGAND *et al.* 1997, ZHANG und CECH 1997), Isomerisierungen (PRUDENT *et al.* 1994), Alkylierungen (WILSON und SZOSTAK 1995) und sogar Michael- (SENGLE *et al.* 2001) und Diels-Alder-Reaktionen (TARASOW *et al.* 1997, HAUSCH und JÄSCHKE 1997). Eines der bemerkenswertesten Ergebnisse war die Identifizierung der ribosomalen RNAs (rRNAs) als aktiven Bestandteil im katalytischen Zentrum von Ribosomen durch Röntgenkristallstrukturanalyse (BAN *et al.* 2000). Dadurch wird unter anderem auch die Hypothese einer „RNA-Welt“ gestützt (GILBERT 1986), die eine evolutiv vorzeitliche Welt beschreibt, in der die grundlegenden Funktionen des Lebens, die Weitergabe von Erbinformation und die enzymatische Stoffwechseltätigkeit, (hauptsächlich) von RNA erfüllt werden.

Der eigentliche Anlass für die „Auszeichnung“ des RNA-Moleküls liegt jedoch in noch jüngerer Vergangenheit. Die Entdeckung, dass sehr kleine RNAs mit einer Länge von 21 bis 28 Nukleotiden in der Zelle entscheidende Aufgaben erfüllen, hat sowohl einen hohen wissenschaftlichen als auch anwendungsbezogenen Wert. Speziell das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) als zellulärer Abwehrmechanismus gegen exogene RNA (FIRE *et al.* 1998, ELBASHIR *et al.* 2001) und auch das Auftreten von micro-RNAs (miRNAs), die in ähnlicher Weise die zelleigene Genexpression steuern (LAU *et al.* 2001, LEE und AMBROS 2001, LAGOS-QUINTANA *et al.* 2001), scheinen von zukunftsreicher pharmakologischer Bedeutung zu sein.

Nicht zuletzt jedoch stellt RNA selbst als Überträger (und z. B. in Form viralen Erbguts auch als Träger) der Erbinformation ein Ziel für den Angriff von Therapeutika dar. So ist seit langem bekannt, dass Aminoglykosidantibiotika wie Streptomycin die Translation in Prokaryoten hemmen. Inzwischen weiß man, dass sie an die A-Stelle des Ribosoms und damit an die 16S rRNA der 30 S Untereinheit binden (KARIMI und EHRENBERG 1994). Neuere Arbeiten zeigen, dass weitere Vertreter dieser Wirkstoffgruppe beispielsweise durch Bindung an die HIV-RNA-Strukturen TAR und RRE die für die Virusreplikation notwendige Wechselwirkung mit den Proteinen Tat und Rev verhindern, dass sie die Spleißreaktion der Gruppe I Introns inhibieren, und dass sie inaktivierend an Hammerhead- und Hepatitis Delta Virus-Ribozyme binden (MICHAEL und TOR 1998).

Die Verwendung von Aptameren (RNA-Strukturen, die kleine Wirtsmoleküle als Liganden binden) für die Entwicklung von allosterischen Ribozymen, die durch die Anlagerung von Verbindungen wie 3',5'-cyclo-Nukleotidmonophosphat, Flavinmononukleotid und Theophyllin gesteuert werden (BREAKER 2002), führte zu der Entdeckung der „*riboswitches*“, genetischer Kontrollelemente in mRNAs, die deren Translation durch Bindung an Metaboliten steuern (WINKLER *et al.* 2002).

Das Ziel dieser Arbeit lag in einem Bereich der Überschneidung der beiden Gebiete, die durch die angeführten Beispiele umrissen wurden, nämlich RNA als Therapeutikum und als Angriffsziel zu verwenden. Verglichen mit Strategien zur gentherapeutischen Veränderung auf DNA-Ebene ergeben sich hier mehrere Vorteile, z. B. ist mRNA im Zytoplasma wesentlich einfacher zugänglich, als die DNA im Zellkern. Außerdem verhindert eine permanente Veränderung des Erbguts auf DNA-Ebene die Möglichkeit der kontrollierten Regulation von gewünschten und vor allem von unerwünschten Effekten. So wurde von zwei Fällen berichtet, in denen Patienten nach erfolgreicher gentherapeutischer

Behandlung von SCID¹ Leukämie entwickelten (CHECK 2002 und 2003). Der gentherapeutische Ansatz beruhte dabei auf der Verwendung von Retroviren, mit denen Korrekturgene in Wirtszellen eingeschleust wurden. An welcher Stelle solche Korrekturgene in die Wirts-DNA eingebaut werden, ist jedoch bisher nicht zu kontrollieren. Es konnte später nachgewiesen werden, dass in den beiden Krebsfällen die retroviralen Vektoren in ein Gen insertiert wurden, das das Zellwachstum und die Zellteilung beeinflusst.

Demgegenüber bieten gentherapeutische Ansätze, die auf die mRNA gerichtet sind, den Vorteil, temporär und damit praktisch reversibel zu sein. Als Beispiele lassen sich die *anti-sense* Strategie und der Einsatz von Ribozymen zur gezielten Beeinflussung der Genexpression und zur Zerstörung viraler oder tumorassoziierter RNA anführen (Übersicht in SULLENGER und GILBOA 2002). Die Zielsetzung dieser Arbeit geht jedoch über die einfache Zerstörung genetischer Information hinaus und beinhaltet die Reparatur genetischer Defekte auf RNA-Ebene. Durch rationales Design sollte ein Ribozym entwickelt werden, das eine Substrat-RNA an zwei definierten Stellen spaltet und anschließend ein neues RNA-Fragment anstelle des herausgeschnittenen Teils einfügt. Ein solches RNA-Reparaturribozym besäße ein großes Potential für die Behandlung von Erbkrankheiten, die auf Insertions-, Punkt- oder Deletionsmutationen beruhen.

¹ *severe combined immune deficiency*, schwerer kombinierter Immundefekt – angeborener Defekt oder Störung der Entwicklung von Immun- bzw. Stammzellen

1 Twinribozyme – Hintergrund und Konzeption der Arbeit

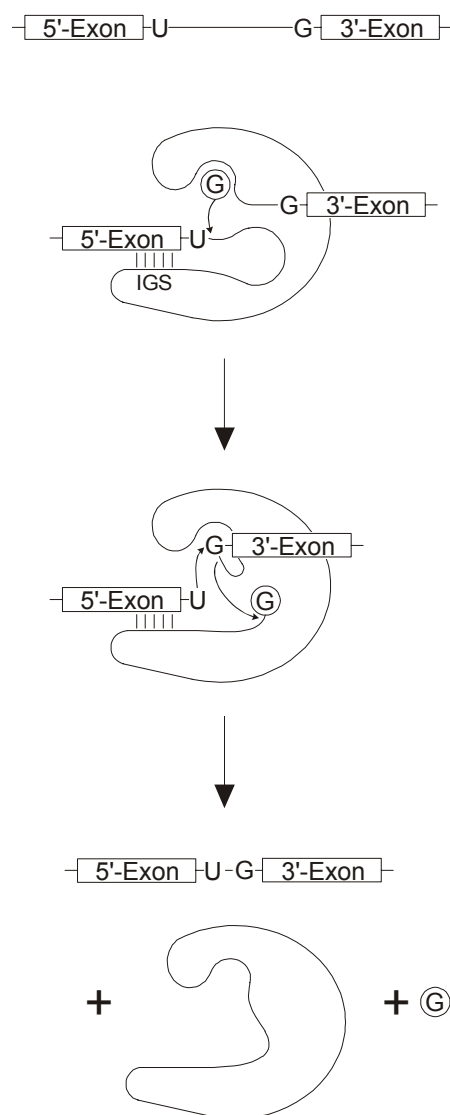
1.1 Ribozym-basierte gentherapeutische Ansätze

Eine erste Strategie der Inaktivierung von Transkriptionsprodukten mittels RNA war das *antisense*-Konzept. Ein Oligonukleotid mit geeigneter komplementärer Sequenz bindet dabei an eine mRNA, wodurch deren Translation verhindert oder deren Abbau bewirkt wird. Die Anwendung solcher *antisense*-Oligonukleotide als Therapeutika ist allerdings problematisch, da die notwendige Zellkonzentration im allgemeinen sehr hoch sein muss, während eine oft zu geringe Spezifität zu unerwünschten Wechselwirkungen führt (SULLINGER und GILBOA 2002). Eine viel versprechende Erweiterung dieses Konzepts stellte deshalb die Verwendung *in trans* spaltender Ribozyme dar, katalytischer Ribonukleinsäuren, die die Ziel-RNA hoch sequenzspezifisch und unter mehrfachem Umsatz schneiden. Das Hammerhead- und das Hairpinribozym, die kleinsten der natürlichen Ribozyme, wurden im Hinblick auf eine solche Anwendung durch Einführung chemischer Modifikationen nukleaseresistent verändert, um die Stabilität in Biofluiden zu erhöhen. Mehrere solcher Ribozym-Therapeutika befinden sich in klinischen Tests gegen Krebs und HIV (USMAN und BLATT 2000).

Die angeführten Strategien, einschließlich Anwendungen, die das viel versprechende Phänomen der RNA-Interferenz nutzen, sind darauf gerichtet, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu inhibieren. Bei vielen genetisch bedingten Krankheiten sind allerdings Expressionsprodukte betroffen, die für die Zellen lebensnotwendig sind, weshalb eine Inhibierung der Translation das Problem nicht löst. Vielmehr würde eine Korrektur der fehlerbehafteten mRNA mit anschließender normaler Einbindung des Reparaturproduktes in den zellulären Translationsablauf für die Bildung intakter Proteine sorgen. Dass dieser Weg mit Ribozymen gangbar ist, haben Cech und Mitarbeiter unter Verwendung der Gruppe I Introns gezeigt (SULLINGER und CECHE 1994, JONES *et al.* 1996) - den Introns,

deren Isolation aus *Tetrahymena thermophila* zur Entdeckung des ersten Ribozyms durch die gleiche Arbeitsgruppe führte (KRUGER *et al.* 1982). Diese selbstsplicing RNA-Sequenzen finden sich in Protozoen, Pilzen, Algen und Bakterien, ihre Größe variiert von einigen hundert bis dreitausend Nukleotiden (TANNER 1999). Der Mechanismus des Spleißens *in cis*, bei dem sich das Intron unter Verknüpfung der beiden Exons selbst herausschneidet, ist in Abb. 1a) dargestellt.

a) *cis*-Spleißen



b) *trans*-Spleißen

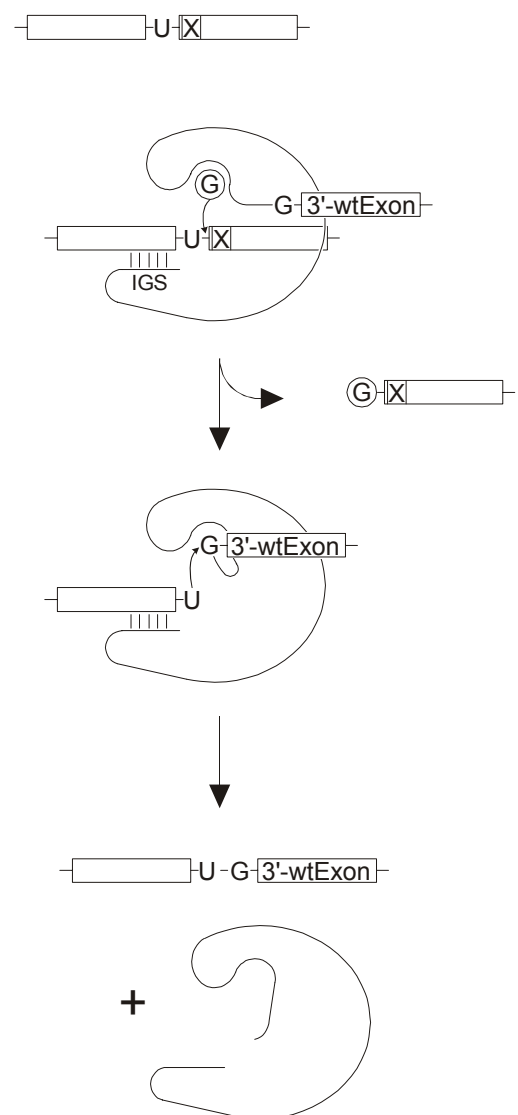


Abb. 1: a) Mechanismus des Spleißens *in cis* von Gruppe I Introns; b) mRNA-Reparatur mittels *in trans* spleißender Gruppe I Ribozyme (X = Mutation, 3'-wtExon = anzufügendes RNA-Fragment mit korrekter „Wildtyp“-Sequenz).

Der erste Schritt umfasst den nukleophilen Angriff der 3'OH-Gruppe eines externen Guanosin-Kofaktors auf die 5'-Spleißstelle, die durch ein konserviertes U gekennzeichnet ist. Es folgt eine Konformationsänderung, bei der das Kofaktor-Guanosin von einem ebenfalls konservierten G am 5'-Ende des 3'-Exons aus der G-Bindungstasche verdrängt wird. Die freigesetzte 3'OH-Gruppe des Uridins am Ende des 5'-Exons greift nun wiederum nukleophil an der 3'-Spleißstelle an, wodurch die beiden Exons miteinander verbunden werden und das Intron herausgelöst wird, das letztlich unter Freisetzung des Kofaktors zyklisiert.

Das 5'-Exon wird während des Spleißens durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der so genannten internal guide sequence (IGS) positioniert. Durch Entfernung der Sequenz zwischen dem konservierten U und der IGS wurden *in trans* spaltende Ribozyme erhalten, die durch Variation der IGS gegen verschiedenste Substratsequenzen eingesetzt werden können. Dies bildete die Basis für den mRNA-Reparaturansatz, der in Abb. 1b) gezeigt ist. Für eine gegebene RNA-Sequenz mit einer Mutation „X“ und einem möglichst nahe gelegenen U in 5'-Richtung lässt sich ein Gruppe I Ribozym konstruieren, das anstelle des 3'-Exons die Korrektursequenz enthält. Nach erfolgter Abspaltung der defekten 3'-Sequenz wird die korrekte RNA an das 5'-Exon ligiert. Zuerst wurde der Erfolg dieser Methode mit der Reparatur mutierter *lacZ*-Transkripte in Bakterien- und Säugerzellen gezeigt. Inzwischen wurden *in trans* spleißende Ribozyme in Zellkulturen erfolgreich gegen defekte Transkripte im Zusammenhang mit Krebs, Muskelschwund und Sichelzellanämie eingesetzt. Problematisch war dabei die geringe Spezifität aufgrund der nur 6 Basen umfassenden IGS, was dazu führte, dass neben der Zielsequenz auch viele andere RNAs ungewollt gespleißt wurden (JONES *et al.* 1996).

Ein ähnlicher Ansatz verwendet Spleißosomen für die Reparatur von defekten Transkripten durch das Spleißen *in trans*. PUTTARAJU *et al.* konnten 1999 zeigen, dass die Methode des „spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing“ (SMaRT) gegen eine Deletionsmutation im Gen für ein Transmembranprotein (CFTR) wirkungsvoll ist, die das Krankheitsbild der Mukoviszidose verursacht. In Zellkulturen konnte damit im Vergleich zu gesunden Zellen ein Niveau von 12-15 % funktionstüchtiger Proteine erreicht werden. Bestätigt sich die Annahme, dass die RNA-Bestandteile des Spleißosoms für seine katalytische Aktivität verantwortlich sind (VALADKHAN und MANLEY 2001), ist auch diese Strategie als erfolgreiche ribozymvermittelte RNA-Reparatur zu werten. Beiden beschriebenen Strategien zur RNA-Reparatur ist allerdings gemeinsam, dass die gesamte Sequenz von der Mutation bis zum Ende der zu reparierenden mRNA, also 3'-abwärts im Falle des Gruppe I

Introns und ein komplettes Exon im Falle des Spleißosoms, in die Reaktion eingebracht werden muss. Befindet sich der Fehler weit weg vom 3'-Ende der mRNA, so ergibt sich ein hoher Aufwand für die Bereitstellung des Reparatur-RNA-Fragments.

Wenn man solch große Ribozyme bzw. RNA-Protein-Komplexe für die Veränderung defekter RNA-Sequenz einsetzen kann, dann sollte die Verwendung kleiner Ribozyme für solch ein Vorhaben viele Vorteile hinsichtlich Synthese und Applikation bringen. Unter diesem Aspekt wurde das Hairpinribozym für ein neues RNA-Reparaturkonzept gewählt.

1.2 Das Hairpinribozym

Das katalytische Motiv des Hairpinribozyms wurde erstmals 1986 im negativen Strang der Satelliten-RNA des *Tobacco Ringspot Virus* entdeckt, in deren komplementärem, positivem Strang auch das Hammerheadribozym gefunden wurde (BUZAYAN *et al.* 1986, Abb. 2).

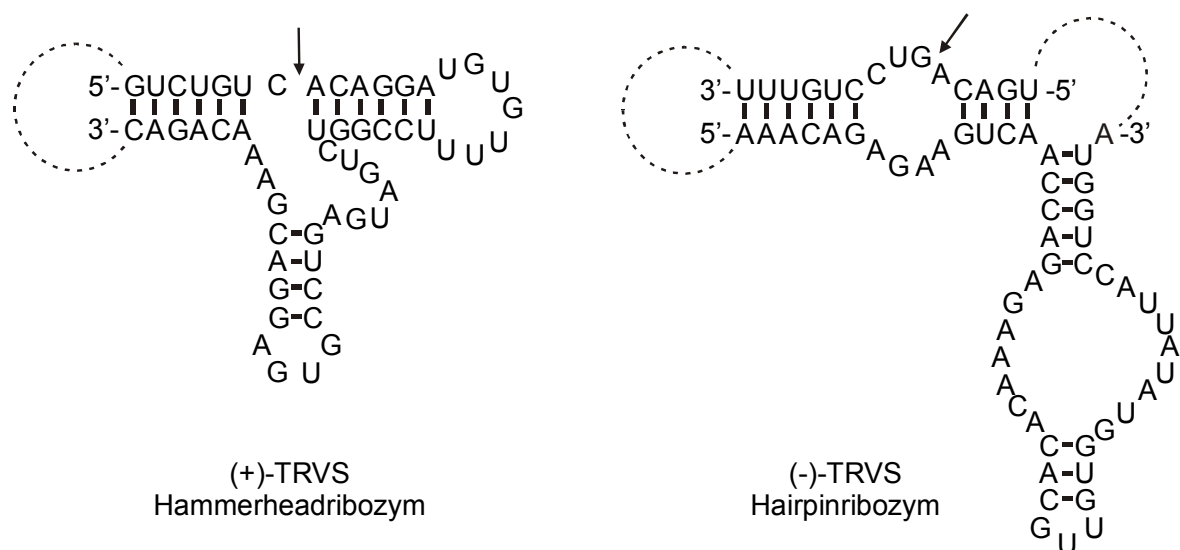


Abb. 2: Sekundärstrukturen der zwei katalytischen Motive, die in den beiden komplementären Formen der zirkulären Satelliten RNA des *Tobacco Ringspot Virus* (TRVS) gefunden wurden (die Pfeile markieren die Spaltstellen).

Beide gehören zur Klasse der kleinen Ribozyme, der auch das *Varkud* Satelliten RNA Ribozym und das *Hepatitis Delta Virus* Ribozym angehören. Alle diese Ribozyme sind

Ribonukleasen und übernehmen die Funktion der Selbstprozessierung einer multimeren Form während der Replikation von viroider, zirkulärer RNA nach dem *rolling circle* Mechanismus (TANNER 1999), wie er in Abb. 3 dargestellt ist.

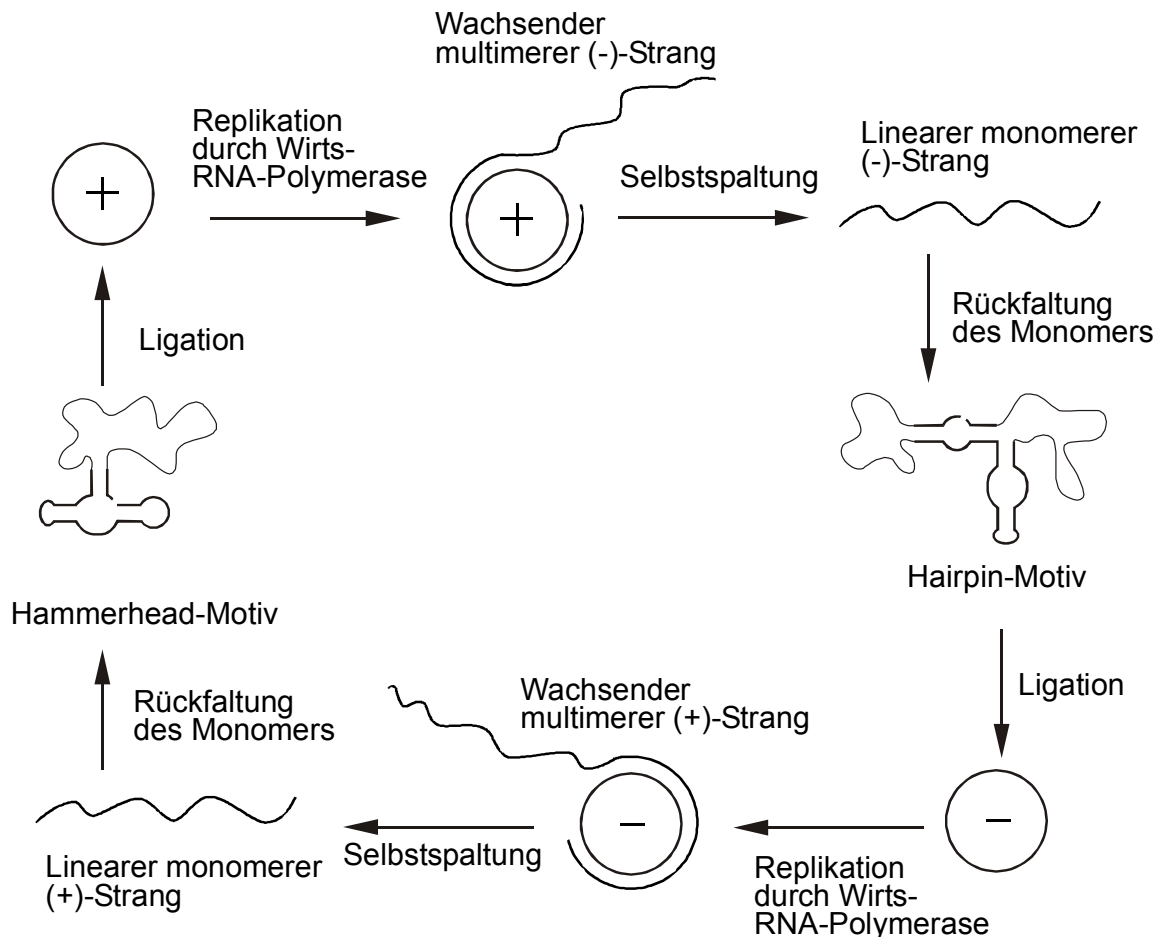


Abb. 3: Schematische Darstellung der Replikation der Satelliten-RNA des *Tobacco Ringspot Virus* nach dem *rolling circle* Mechanismus.

Ausgehend von der zirkulären (+)-Strangmatrize wird durch Replikation eine multimer, lineare Form des komplementären (-)-Stranges gebildet, deren Prozessierung in einzelne Einheiten durch Selbstspaltung erfolgt, die im (-)-Strang vom Hairpinribozym vermittelt wird (Abb. 3). Nach Rückfaltung und Ligation der freien Enden eines Monomers durch das gleiche katalytische Motiv entsteht die zirkuläre (-)-Form der Satelliten-RNA, die wiederum als Matrize für die analoge Replikation der (+)-Form dient. Interessanterweise

wird die Selbstspaltung und -ligation des (+)-Stranges von einem Hammerheadribozym bewirkt, das in einem anderen Teil der RNA-Sequenz lokalisiert ist.

In Abb. 4 ist die Sekundärstruktur der 359 Nukleotide umfassenden zirkulären Form der Satelliten-RNA gezeigt, wie sie das Programm „Mfold“ (online unter „<http://mfold.burnet.edu.au/>“) berechnet.

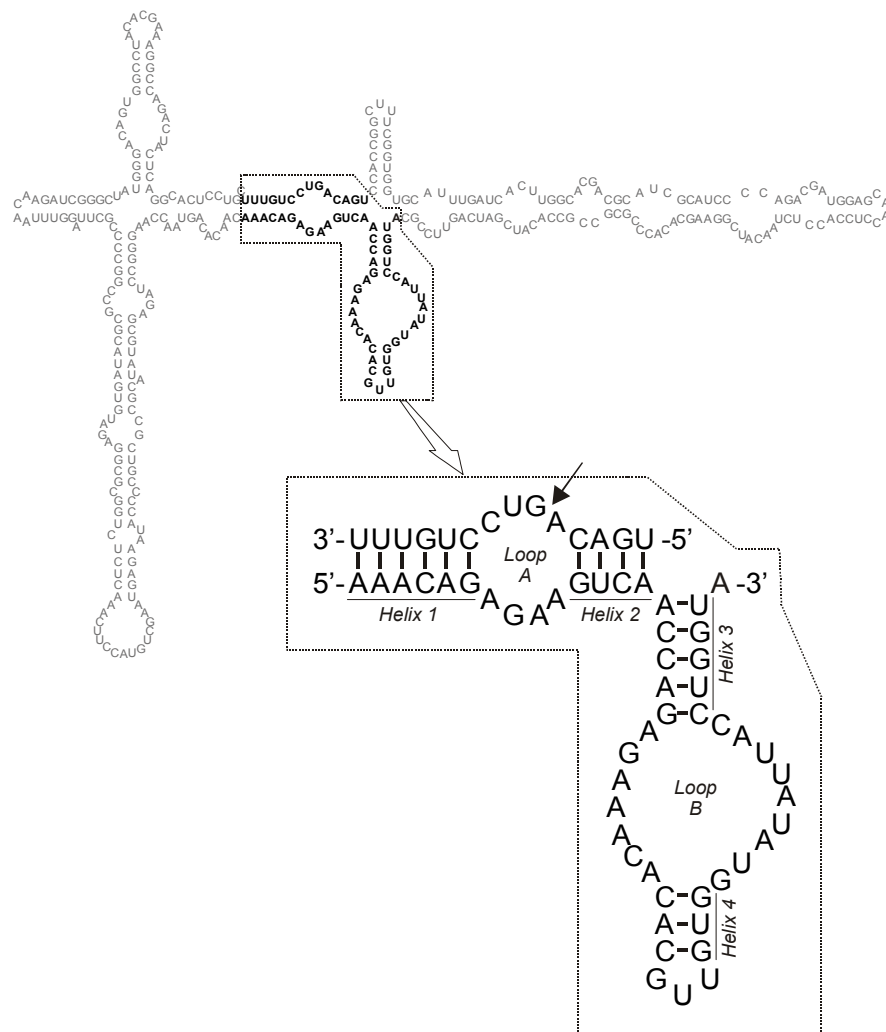


Abb. 4: Primär- und Sekundärstruktur der 359 Nukleotide umfassenden, zirkulären Tobacco Ringspot Virus Satelliten-RNA, sowie die daraus abgeleitete minimale, in trans spaltende Form des Hairpinribozyms.

Durch schrittweise Reduktion der Nukleotidsequenz mit anschließenden Aktivitätstests konnte daraus die für die katalytische Aktivität benötigte Minimalform des Hairpinribozyms extrahiert werden (HAMPEL und TRITZ 1989). Diese besteht aus zwei Domänen A und B, jede gekennzeichnet durch einen zentralen Loopbereich und zwei

flankierende Watson-Crick-Helices (Helix 1 - Loop A - Helix 2 und Helix 3 - Loop B – Helix 4, s. Abb. 4). Die katalytisch spaltbare Phosphodiesterbindung befindet sich in Loop A und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Während es sich beim Virusgenom um eine Prozessierung in Position *cis* handelt, bei der der katalytische Teil und der die Spaltstelle tragende Substratteil zu einem Molekül gehören, stellt die Minimalsequenz ein *in trans* spaltendes Ribozym dar, bei dem diese beiden Bereiche in verschiedenen RNA-Strängen lokalisiert sind, so dass man hier von einem echten katalytischen System sprechen kann. Verschiedenste Untersuchungen, wie der Sequenzvergleich verschiedener natürlich auftretender Varianten des Hairpinribozyms (HASELOFF und GERLACH 1988, RUBINO *et al.* 1990), *in vitro*-selektive Methoden (BERZAL-HERRANZ *et al.* 1992, JOSEPH *et al.* 1993) und sequenzspezifische Mutationsexperimente (HAMPEL *et al.* 1990, CHOWRIRA und BURKE 1991, SEKIGUCHI *et al.* 1991), haben zur Generation einer Consensus-Sequenz für die katalytische Aktivität geführt, wie sie in Abb. 5a gezeigt ist (BERZAL-HERRANZ *et al.* 1993).

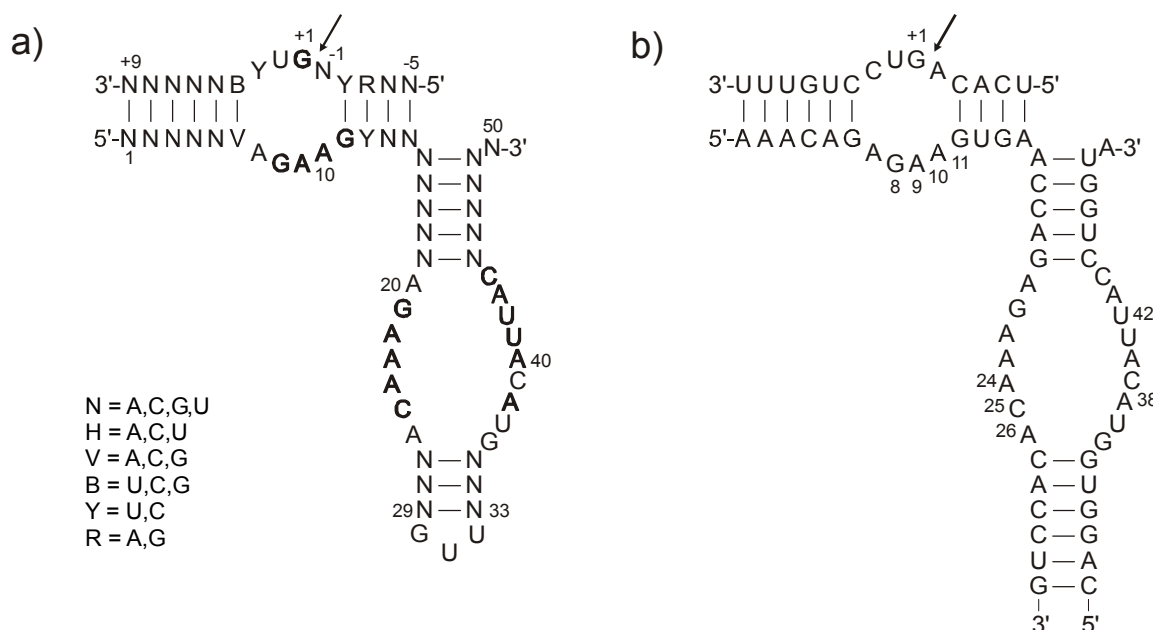


Abb. 5: (a) Consensus-Sequenz des Hairpinribozyms mit gängiger Nummerierung der Nukleotide (BUTCHER und BURKE 1994), fett hervorgehobene Nukleotide sind essentiell für die katalytische Aktivität; (b) Sequenz einer häufig für Studien verwendeten, minimalen Form mit zweisträngigem Ribozymteil (HP-WT), nummerierte Nukleotide spielen eine entscheidende Rolle bei Interdomänenwechselwirkungen oder im katalytischen Zentrum.

Wie man erkennen kann, sind die Sequenzen der Helix-Bereiche nahezu frei wählbar, solange die Komplementarität erhalten bleibt. In den Loop-Bereichen hingegen befinden sich stark konservierte Nukleotide für die Spaltaktivität (fett hervorgehoben). Daraus lässt sich ableiten, dass diese Nukleotide eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Aktivkonformation oder beim katalytischen Reaktionsschritt spielen.

Durch *crosslink*-Studien (EARNSHAW *et al.* 1997, PINARD *et al.* 1999) und FRET-Experimente (MURCHIE *et al.* 1998, WALTER *et al.* 1998) konnte bewiesen werden, dass ein Abknicken zwischen Helix 2 und Helix 3 dazu führt, dass sich A- und B-Domäne büroklammerartig übereinanderlagern, wodurch sich Loop A und Loop B sehr nahe kommen und eine katalytisch aktive tertiäre Anordnung ausbilden können. Dies wurde durch die Kristallstrukturen der Gruppe um Ferré-D'Amaré bestätigt (RUPERT und FERRE-D'AMARE 2001), deren Basis ein komplexeres Hairpinribozym mit einer 4fach helical gekreuzten Struktur ist (*four-way junction*, wie im Virusgenom in Abb. 4). Die daraus abgeleiteten Rückschlüsse auf Struktur und Mechanismus decken sich aber mit Ergebnissen vieler älterer Studien, die mit der Minimalform durchgeführt wurden (eine Übersicht findet sich bei FEDOR 2000). Es existieren mittlerweile drei Röntgenkristallstrukturen, die die unterschiedlichen Stadien der Reaktion simulieren sollen (RUPERT *et al.* 2002): Ein Komplex des Ribozyms mit einem unspaltbaren Substrat, das ein 2'-Desoxyadenosin anstelle des A-1 enthält, repräsentiert den Grundzustand, eine Struktur mit einem pentavalenten Vanadat statt des zu spaltenden Phosphodiesters bildet ein Übergangszustandsanalogon und der Produktkomplex wurde durch die Verwendung eines All-RNA-Substrates generiert, das zum überwiegenden Teil gespalten vorliegt. Die wichtigsten tertiären Kontakte zwischen A- und B-Domäne werden demzufolge durch folgende Wechselwirkungen erreicht (RUPERT und FERRE-D'AMARE 2001, s. Abb. 6):

- das „Ribose Zipper“-Motiv, das Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den 2'-Hydroxygruppen von A10, G11, A24 und C25 und den N3 von A10 und A24 umfasst (bereits postuliert in EARNSHAW *et al.* 1997/2000);
- ein Watson-Crick-Basenpaar zwischen C25 und G+1, das in der Aktivkonformation aus der A-Domäne herausgedreht vorliegt (vorgeschlagen von PINARD *et al.* 1999);
- zusätzlich wird G+1 durch Basenstapelung in einer Bindungstasche in der B-Domäne zwischen A38 und A26 fixiert
- U42 liegt zwischen den beiden Domänen und bildet beidseitig H-Brücken aus.

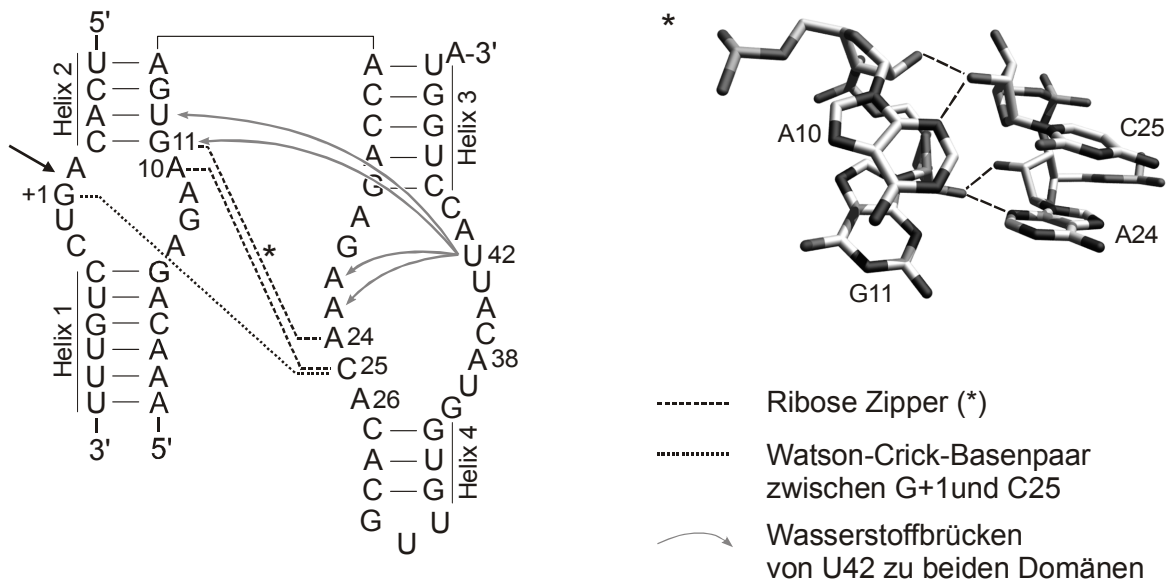


Abb. 6: Illustration der wichtigsten tertiären Kontakte zwischen den beiden Domänen des Hairpinribozyms am Beispiel der zweisträngigen Minimalform.

Genauso bedeutend wie die abgeleiteten Strukturinformationen sind die Folgerungen über den Mechanismus der ribozymkatalysierten Reaktion. Der eigentliche chemische Schritt beinhaltet den Angriff der 2'-OH-Gruppe auf den Phosphor des benachbarten Phosphodiesters gemäß einem S_N2 -Mechanismus. Dabei wird ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand durchlaufen, und unter Inversion am Phosphor entstehen die charakteristischen Produkte, eine freie 5'-OH-Gruppe und ein 2',3'-Cyclophosphat (Abb. 7).

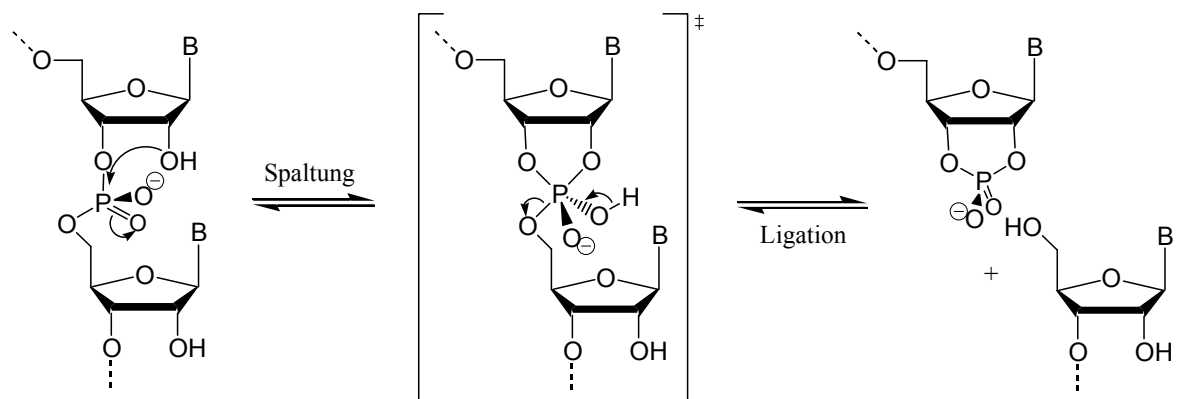


Abb. 7: Mechanismus der vom Hairpinribozym vermittelten Spaltung bzw. Ligation.

Die Reaktion verläuft reversibel über den gleichen Übergangszustand (NESBITT *et al.* 1999), und die Rückreaktion, die Verknüpfung der beiden Fragmente, wird als Ligation bezeichnet. Wie bei anderen funktionalen Nukleinsäuren sind kationische Kofaktoren für die Aktivität des Hairpinribozyms notwendig. Unter Standardbedingungen erreicht die Reaktion in Anwesenheit von Magnesiumionen die besten Schnittraten (CHOWRIRA *et al.* 1993). Die Tatsache, dass auch Kobalthexamin (HAMPEL und COWAN 1997), ein bezüglich Ligandenaustausch inertes Komplexkation, und kationische Polyamine und Peptide als Kofaktoren fungieren können (EARNSHAW *et al.* 1998), führte zu der Schlussfolgerung, dass diese Ionen nicht am katalytischen Schritt mitwirken, sondern eher eine strukturstabilisierende Rolle spielen. In der Tat wurden keine der bei der Kristallisation zugesetzten Calcium-Ionen in der Nähe des aktiven Zentrums gefunden, was eine direkte Beteiligung von Metallionen an der katalytischen Reaktion, wie es von anderen Ribozymen bekannt ist, ausschließt. Die räumliche Anordnung der Nukleotide in den drei Kristallstrukturen (Abb. 8) deutet eher darauf hin, dass ein Wasserstoffbrückengerüst von benachbarten Nukleobasen zum reaktiven Phosphodiester die ideale lineare Anordnung der an der S_N2 -Reaktion beteiligten Atome bewirkt und dadurch den katalytischen Schritt begünstigt. Inwieweit diese Nukleobasen als Säure-Base-Katalysatoren eine Rolle spielen oder ob Wassermoleküle als Protonendonatoren und -akzeptoren fungieren, lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht eindeutig ableiten. Aufgrund der einzelnen Atomabstände lassen sich dem Eduktkomplex zwei, dem Übergangszustandsanalogon fünf und dem Produktkomplex drei solcher H-Brücken zuordnen. Die Autoren der Kristallstrukturen schlagen deshalb vor, dass sich das Hairpinribozym gemäß Paulings Postulat für Enzyme verhält: Die katalytische Beschleunigung der Reaktion erfolgt demnach durch die stärkere energetische Absenkung des Übergangszustandes relativ zum Ausgangs- und Endzustand. Das Wasserstoffbrückenmuster und die vielen experimentellen Daten lassen sich aber auch anders interpretieren. So liegt in allen drei Kristallstrukturen G8 in protonierter Form vor (Abb. 8a, b, c) und könnte den negativ geladenen Übergangszustand elektrostatisch stabilisieren und zusätzlich durch H-Brücken die nukleophile 2'-OH-Gruppe von G+1 für den nukleophilen Angriff bei der Spaltung aktivieren bzw. die 2'-Oxyanion-Fluchtgruppe bei der Ligation binden (LEBRUSKA *et al.* 2002). Experimente zur „Protonenbestandsanalyse“ (*proton inventory analysis*) haben aber gezeigt, dass beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zwei Protonen übertragen werden (PINARD *et al.* 2001).

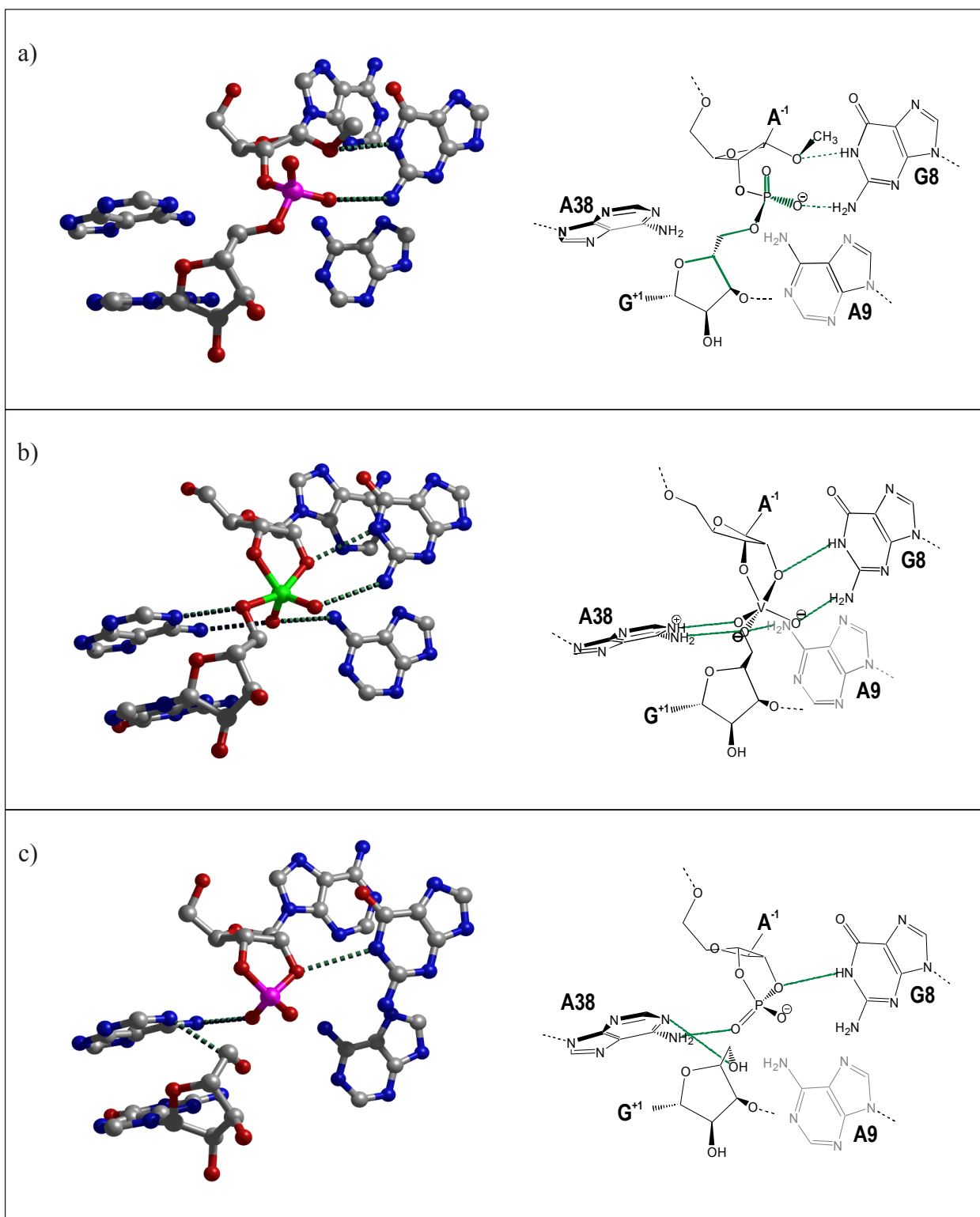


Abb. 8: Mechanismus der katalytischen Reaktion: Molekulare Anordnung in der Umgebung der Spaltstelle, wie sie aus den Kristallstrukturdaten eines Ribozym-Inhibitorsubstrat-Komplexes (a), eines Komplexes mit Übergangszustandsanalogon (b) und eines Ribozym-Produkt-Komplexes (c) abgeleitet werden kann (Daten aus RUPERT *et al.* 2002).

Im Ribozym-Substrat-Komplex, der den Grundzustand der Reaktion darstellen soll, wurde ein unspaltbares Substrat eingesetzt, bei dem die 2'-OH-Gruppe an G+1 methyliert ist. Mit der Annahme, dass die Protonierung von G8 im Eduktkomplex durch diese Veränderung bedingt ist, lässt sich der Mechanismus des 2fachen Protonentransfers sehr gut durch ein Modell erklären, in dem sowohl G8 als auch A38 als generelle Säure-Base-Paare an der Reaktion beteiligt sind. Demzufolge akzeptiert N1 von G8 bei der Spaltung ein Proton von der 2'OH-Funktion von A-1 und die an N1 protonierte Form von A38 überträgt ein Proton auf den 5'-Sauerstoff des austretenden G+1 (Abb. 8b). Analog dazu wirkt A38 bei der Ligation als Base und G8 als Säure (Abb. 8c). Für einen solchen Mechanismus ist aber eine deutliche Verschiebung der pK_S -Werte der beteiligten Iminoprotonen in Richtung Neutralpunkt notwendig. Dies kann zum Beispiel durch die H-Brücken der exocyclischen Aminofunktionen von G8 und A38 an Phosphatgruppen bewirkt werden, wie es für ein Cytosin im Hepatitis Delta Virus Ribozym gezeigt wurde (PERROTTA *et al.* 1999, NAKANO *et al.* 2000). Berechnete Reaktionsprofile für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert, die solche verschobenen pK_S -Werte einbeziehen (BEVILACQUA 2003), stimmen ausgezeichnet mit den gemessenen pH-Profilen dieser Reaktion überein (NESBITT *et al.* 1997, PINARD *et al.* 2001) und stützen damit das Modell der Katalyse durch konjugierte Säure-Base-Paare.

Das Hairpinribozym zeichnet sich unter den katalytischen Nukleinsäuren dadurch aus, auch die Ligrationsreaktion effektiv zu katalysieren. Das entsprechende Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{Spaltung}}:k_{\text{Ligation}}$ wurde zu 1:10 (Verdünnungsexperimente mit einem *in cis* spaltenden Ribozym, NESBITT *et al.* 1999) bzw. zu 1:2 (Einzelmolekül-FRET, ZHUANG *et al.* 2002) bestimmt. Das Konzentrationsverhältnis Edukt:Produkt in Reaktionslösungen ist aber immer auch von den Dissoziationskonstanten der Komplexe mit dem Ribozym abhängig, so dass beispielsweise für die Minimalform in Abb. 5b das Gleichgewicht fast vollständig auf Seiten der Spaltprodukte liegt, da diese durch Dissoziation aus dem chemischen Gleichgewicht entfernt werden. Alle Faktoren, die die Stabilität des Ribozym-Spaltprodukt-Komplexes erhöhen, begünstigen demgemäß die Ligation. Aufgrund der Spalt- und Ligationseigenschaften bildete das Hairpinribozym die Grundlage für das in dieser Arbeit verfolgte RNA-Reparatur-Konzept.

1.3 Twinribozyme für die RNA-Reparatur

Das in unserer Gruppe verfolgte Reparaturkonzept beinhaltet den sequenzspezifischen Austausch eines RNA-Fragmentes innerhalb eines längeren Substratstranges. Dazu muss notwendigerweise der Zielstrang (z.B. die mRNA) zuerst an zwei definierten Stellen gespalten werden, und nach Austausch des originalen Sequenzstücks gegen ein Reparaturfragment bedarf es einer zweifachen Ligation, um einen durchgängigen, reparierten Produktstrang zu erhalten.

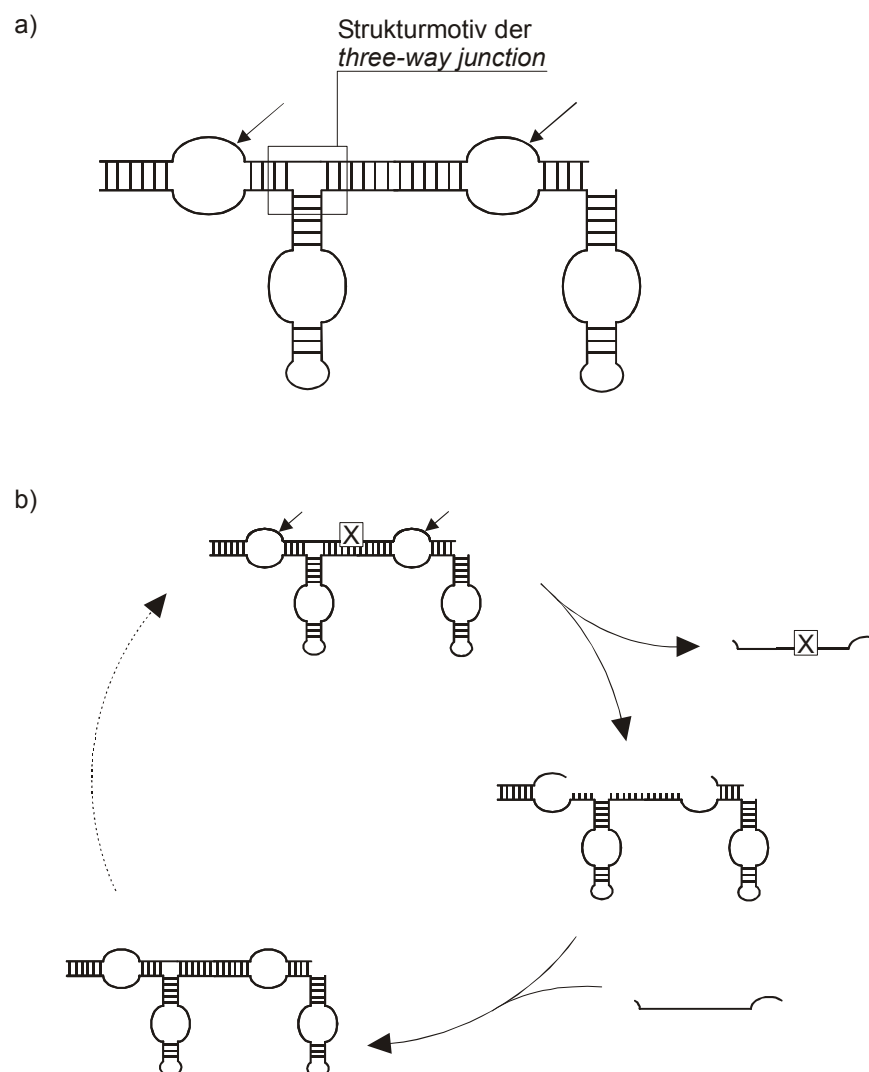


Abb. 9: a) Verknüpfung zweier Hairpinribozyme zu einem Twinribozym und b) Prinzip der damit katalysierten RNA-Reparatur durch zweifache Spaltung eines fehlerhaften RNA-Zielstranges [X] und anschließendes Einfügen eines korrekten Sequenzabschnitts durch zweifache Ligation.

Eine Kombination zweier Hairpinribozyme sollte geeignet sein, diese Reaktionsabfolge zu katalysieren. Die einfachste Variante einer Verknüpfung zweier Einheiten ist eine Tandemkonfiguration, wie sie in Abb. 9a dargestellt ist, und entsprechend der Verdopplung des katalytischen Motivs wurde das entstehende Konstrukt als Twinribozym bezeichnet. Die angestrebte Form der RNA-Reparatur durch zweifachen Schnitt, Fragmentaustausch und zweifache Ligation durch ein solches Twinribozym ist schematisch in Abb. 9b gezeigt.

Wie zu erkennen, musste die Minimalform des Hairpinribozyms dafür zunächst um eine weitere Helix zu einer *three-way junction* erweitert werden, einer Struktur, bei der sich drei Helices in einem Punkt treffen. Außerdem waren Spalt- und Ligationsverhalten der Einzelmotive zu bestimmen und zu optimieren. Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse sollten dann Twinribozyme synthetisiert werden, um Reparaturtests an geeigneten RNA-Substraten durchzuführen.

2 Synthese der Ribozyme und Substrate

2.1 Chemische RNA-Synthese

2.1.1 Das Standard-Phosphoramidit-Verfahren

Das derzeit meistverwendete Verfahren für die Festphasensynthese von RNA-Oligomeren ist die Phosphoramidit-Methode (SCARINGE *et al.* 1990), bei der als Nukleotidbausteine *O*- β -Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidite eingesetzt werden, die 5'-*O*-Dimethoxytrityl- (DMTr) und 2'-*O*-*t*-butyl-dimethylsilyl (TBDMS) geschützt sind (Abb. 10).

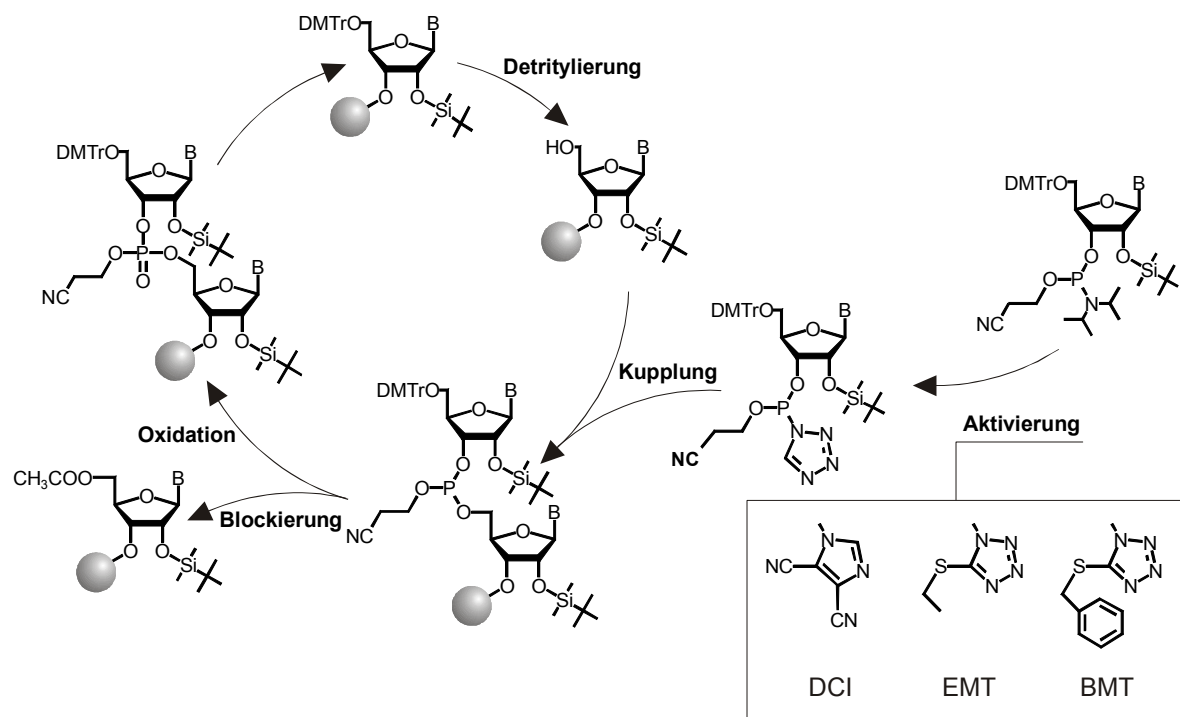


Abb. 10: Syntheszyklus des Phosphoramiditverfahrens.

Diese Methode basiert auf der für die DNA-Synthese bereits von Letsinger eingeführten Synthesestrategie, die einen reaktiven Phosphor(III)-baustein verwendet (LETSINGER *et al.* 1975). Dieser wird aus *N,N*-Diisopropylphosphoramiditen und Tetrazol bzw. Tetrazolderivaten *in situ* gebildet und durch die freie 5'-OH-Gruppe am Ende der wachsenden Kette angegriffen. Nach Blockierung der nichtreagierten OH-Gruppen per Acetylierung erfolgt die Oxidation der immer noch reaktiven Phosphorigsäuretriester zu stabilen Phosphorsäuretriestern mit wässriger Iodlösung. Die saure Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe setzt die 5'-OH-Gruppe für einen neuen Zyklus frei und ermöglicht die einfache photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeuten in einer Durchflusszelle. Genau wie bei der DNA- werden bei der RNA-Synthese die Phosphoramiditfunktionen mit der β -Cyanoethyl-Gruppe geschützt, die schon unter milden alkalischen Bedingungen vollständig über β -Eliminierung abgespalten werden kann. Im Gegensatz zur DNA weist RNA aber eine erhöhte Instabilität gegenüber basischen Bedingungen auf, die durch die zusätzlichen 2'-OH-Gruppen bedingt ist. Zum einen werden deshalb für die nukleophilen exocyclischen Aminogruppen der Nukleobasen labile Schutzgruppen verwendet, namentlich für Adenosin die Phenoxyacetyl- (PAC), für Guanosin die Isopropylphenoxyacetyl- (iPr-PAC) und für Cytidin die Acetyl-Gruppe, die postsynthetisch mit ammoniakgesättigtem Methanol bei Raumtemperatur entfernt werden können. Unter diesen Bedingungen werden auch die Phosphatschutzgruppen abgespalten und die Verknüpfung an den Polystyren- oder CPG-Träger gelöst, die über einen Succinatlinker realisiert ist. Zum anderen sind die 2'-OH-Funktionen gewöhnlich mit der *tert*-Butyldimethylsilylgruppe geschützt (OGILVIE *et al.* 1974), die durch Triethylamin-Trihydrofluorid in DMF entfernt werden kann (GASPARUTTO *et al.* 1992). Da diese Schutzgruppen sowohl im Sauren als auch im Basischen stabil sind, bleiben sie während der Synthese erhalten und können zuletzt abgespalten werden, so dass die stabilisierende Wirkung längstmöglich erhalten wird. Nachteil dieser zusätzlichen Schutzgruppen ist eine verringerte Kupplungsausbeute. Bei der Standard-RNA-Synthese mit Tetrazol als Aktivator und 2'-*O*-TBDMS-Schutzgruppen liegt diese durchschnittlich bei 96 bis 97 % je Kupplungsschritt gegenüber Ausbeuten von > 99 % bei der DNA-Synthese unter analogen Bedingungen. Dieser Unterschied erscheint zunächst nicht sehr groß, limitiert jedoch die Kettenlänge zu synthetisierender RNAs sehr stark. So ergibt sich rechnerisch für ein 50-mer (ein Oligonukleotid mit einer Länge von 50 Nukleotiden) bei 99 % Ausbeute je Kupplung eine Gesamtausbeute von etwa 60 %, bei durchschnittlich 97 % je Einzelschritt sind es nur noch 22 %.

Aus diesem Grunde wurde nach Wegen gesucht, die Kupplungsausbeuten bei der chemischen RNA-Synthese nach dem Phosphoramiditverfahren zu erhöhen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung anderer Schutzgruppen für die 2'-OH-Funktion. Diesbezüglich sind zwei neuere Arbeiten zu nennen, die von Pitsch und Mitarbeitern entwickelte „TOM“-Methode und das „ACE“-Verfahren von Scaringe (Abb. 11). Erstere beruht auf der Verwendung 2'-O-Triisopropylsilyloxymethyl (2'-O-TOM) geschützter Nukleotide (PITSCH *et al.* 2001). Bei der TOM-Gruppe liegt die sperrige Triisopropylsilyleinheit durch ein Formaldehydacetal weiter vom Reaktionszentrum, der Phosphoramiditgruppe, entfernt, was zu den verbesserten Ausbeuten (> 99 %) führen soll. Da es sich wie bei der TBDMS-Gruppe um eine fluoridlabile Schutzgruppe handelt, kann die Methodik ohne Probleme auf konventionelle Syntheseautomaten übertragen werden, allerdings sind die entsprechenden Amidite und Reagenzien erst seit kurzem kommerziell erhältlich und im Vergleich zu den Standardbausteinen erheblich teurer.

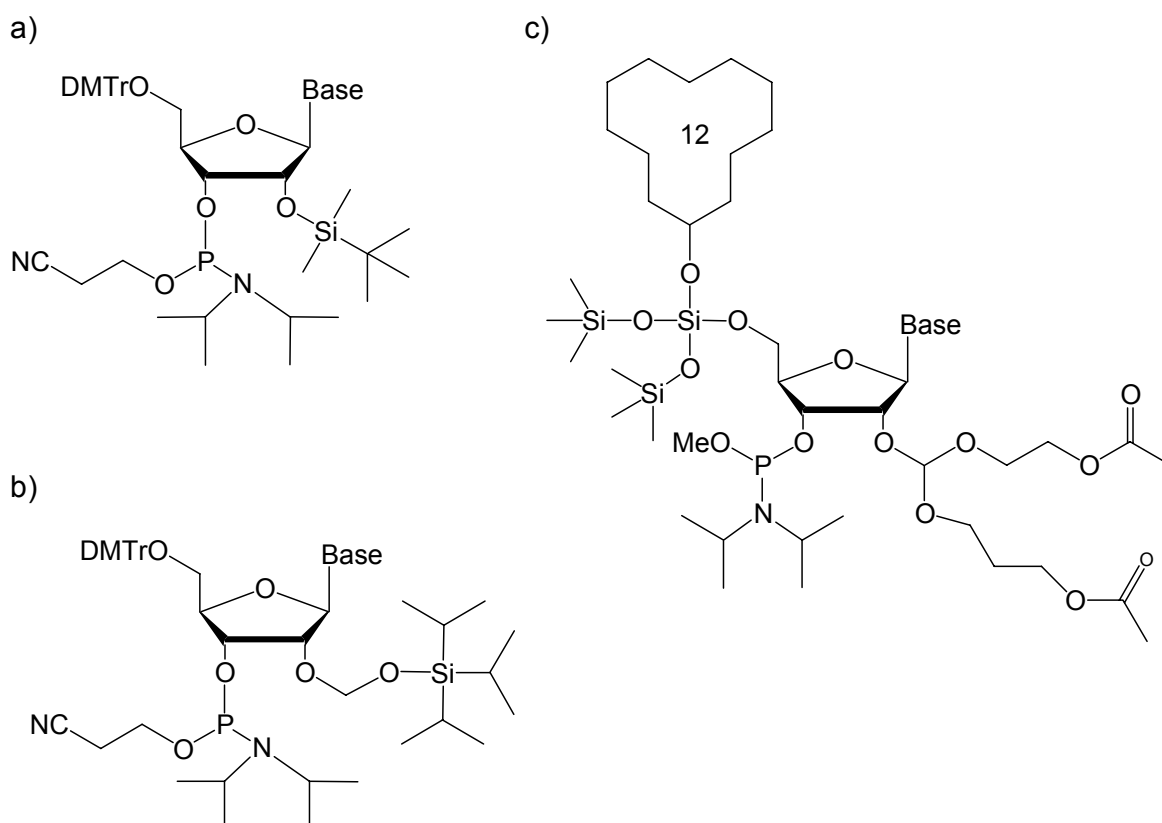


Abb. 11: Phosphoramiditbausteine für die RNA-Synthese nach dem a) (Standard-) TBDMS-, b) TOM- und c) ACE-Verfahren.

Die zweite Strategie verwendet ein invertiertes Schutzgruppenmuster, hier ist die 2'-OH-Funktion mit der säurelabilen Bis(2-acetoxyethoxy)methylgruppe (ACE) blockiert, während die 5'-OH-Funktion mit der fluoridspaltbaren Bis(trimethylsiloxy)-cyclododecyloxysilylgruppe (DOD) versehen ist (SCARINGE *et al.* 2001). Auch hier werden Kupplungsausbeuten > 99 % erreicht, ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen Methoden liegt aber bei der Aufarbeitung und der Reinigung der Oligonukleotide. Bei der basischen Abspaltung der Basenschutzgruppen und der gleichzeitigen Lösung vom Polymerträger werden auch die Acetylgruppen von der ACE-Funktion entfernt. Es verbleibt ein sehr hydrophiler Orthoester an der 2'-OH-Funktion, der die RNAs weiter gegen basisch katalysierten Strangbruch schützt, die Löslichkeit in polaren Solventien erhöht und die Ausbildung sekundärer und tertiärer Strukturen verhindert, die bei der anschließenden HPLC-Reinigung stören können. Erst nach der Isolierung der gewünschten Syntheseprodukte erfolgt die Spaltung der Orthoester unter sehr milden, sauren Bedingungen, unter denen die synthetisierten RNAs völlig stabil sind. Die isolierten Produkte sind damit von sehr hoher Reinheit. Auch diese Methode lässt sich auf die üblichen Synthesautomaten transferieren, aber die Kosten für die Synthese liegen auch hier bisher weit über den Aufwendungen für das Standardverfahren.

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Kupplungsausbeuten bei der TBDMS-Standardmethode ist die Wahl anderer Aktivatoren als Tetrazol. Als effektiver haben sich hier vor allem 5-(Ethylmercapto)-1*H*-tetrazol (WINCOTT *et al.*, 1995) und 4,5-Dicyanoimidazol (VARGESE *et al.*, 1998) erwiesen. Im Zusammenhang mit der TOM-Chemie wurde 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol als Aktivator eingeführt (PITSCH *et al.* 2001), jedoch ist eine Verwendung für die TBDMS-Methode bislang nicht beschrieben worden. Aus diesem Grunde und zum Zwecke der Optimierung unserer chemischen RNA-Synthese wollten wir das Potential von 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol als Aktivator im Standardsystem evaluieren.

2.1.2 Synthese von 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol (BMT)

Die meistverwendete Methode zur Darstellung 5-substituierter 1*H*-Tetrazole ist die dipolare [3+2]-Cycloaddition von Nitrilen, Isocyanaten und Isothiocyanaten mit Aziden (Abb. 12).

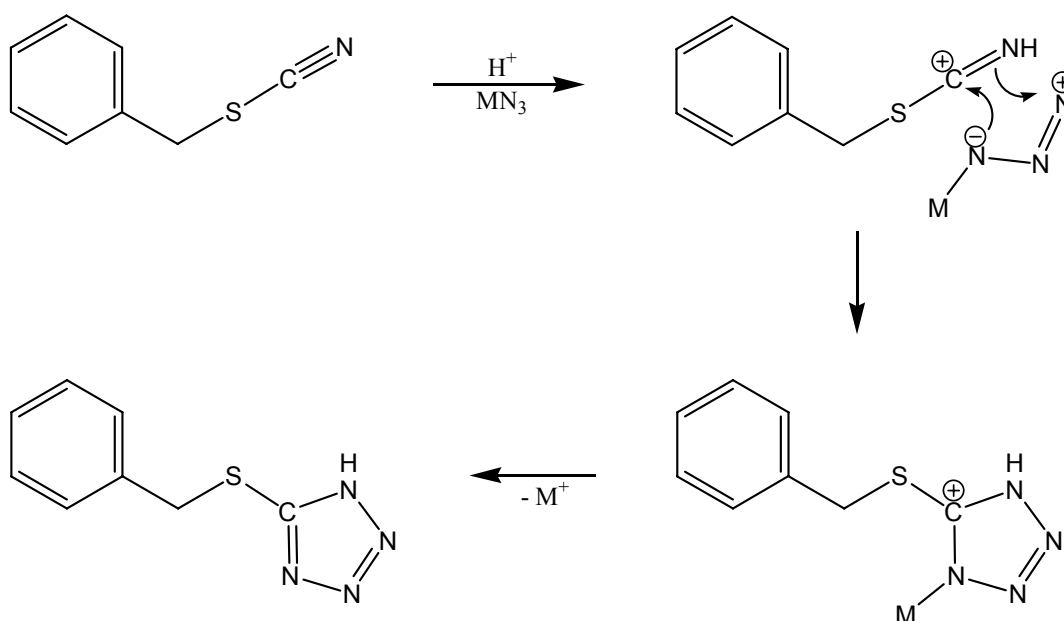


Abb. 12: Synthese von 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol durch [3+2]-Cycloaddition von Benzylthiocyanat und Aziden ($M = \text{Na}, \text{Li}$ oder NH_4).

Bei Verwendung von Benzylthiocyanat und Ammoniumazid in DMF konnten FINNEGAN *et al.* (1958) 22 % Ausbeute an Benzylmercaptotetrazol (BMT) isolieren. LIEBER und ENKOJI (1961), die sich eingehender mit dieser Reaktion beschäftigten, setzten Natriumazid und Ammoniumchlorid als sauren Katalysator in wässrigem Dioxan ein, erhielten jedoch auch nur 27 % Ausbeute. Im Ergebnis dieser Untersuchung wurden jedoch bereits mehrere reaktionsbestimmende Faktoren deutlich. Bei Temperaturen über 100 °C findet Zersetzung des gebildeten Tetrazols in Stickstoffwasserstoffsäure HN_3 und das Thiocyanat statt, so dass geringere Temperaturen bei längeren Reaktionszeiten zu höheren Ausbeuten führen. Wasserzusatz erniedrigt zwar die Löslichkeit des aromatischen Thiocyanats, bewirkt aber die Lösung des Natriumazids, was sich ebenfalls positiv auf die Ausbeute auswirkt. Da NaN_3 in Wasser allerdings stärker ionisch vorliegt, wird auch die Wahrscheinlichkeit für die nukleophile Substitution der Thiocyanatgruppe erhöht. Die Reaktionsführung konnte entscheidend durch den Einsatz eines Phasentransferkatalysators (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, HDTMAB) verbessert werden (LEBLANC und JURISIC 1998). In einem Wasser/Toluen-Gemisch wurden damit 48 %, bei Ansatzvergrößerung sogar 63 % Ausbeute erhalten. Die Autoren begründeten das durch die verringerte notwendige Reaktionstemperatur, die die Cycloaddition im Verhältnis zur Substitutionsreaktion stärker

begünstigt. Eine neuere Arbeit konzentriert sich auf die ausschließliche Verwendung von Wasser als Lösungsmittel unter Verwendung von ZnBr_2 als Katalysator und beschreibt eine Ausbeute von 57 % BMT (DEMKO und SHARPLESS 2001).

Tab. 1: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der BMT-Synthesen im 0.02 mol Maßstab.

| # | Azid | LM | Katalysator/Zusatz | T (°C) / t (h) | Ausbeute |
|----|----------------|------------------------------|---|----------------|-----------------------|
| 1 | LiN_3 | Dioxan | NH_4Cl | 70 / 96 | 12 |
| 2 | LiN_3 | Dioxan | NH_4Ac | 90 / 6 | 65 |
| 3 | NaN_3 | Toluen/ H_2O | NH_4Cl , HDTMAB ^{a)} | 90 / 6 | 28 |
| 4 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl , HDTMAB | 90 / 6 | 34 |
| 5 | NaN_3 | Toluen/ H_2O | NH_4Cl , HDTMAB | 70 / 96 | 43 ^{b)} |
| 6 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl , HDTMAB | 70 / 96 | 55 |
| 7 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl | 90 / 6 | 30 |
| 8 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl , Raschigringe | 90 / 6 | 62 |
| 9 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl , Raschigringe | 70 / 24 | 63 |
| 10 | NaN_3 | Dioxan/ H_2O | NH_4Cl , Raschigringe | 70 / 96 | 67...72 ^{c)} |

a) Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Phasentransferkatalysator; b) Dieser Ansatz entspricht den Bedingungen von LEBLANC und JURISIC (1998), deren 5fach größerer Ansatz lt. Lit. 63 % Ausbeute ergab; c) Variation der Ansatzgröße von 0.01 bis 0.5 mol ergab gleich bleibend hohe Ausbeuten.

Unsere Ansätze zur Optimierung der Cycloadditionsreaktion waren auf einfache Durchführung gerichtet und folgten aus den beschriebenen Ergebnissen. Um Substitutionsreaktionen einzuschränken, wollten wir in wasserfreiem Dioxan arbeiten und wählten als Azidquelle das darin lösliche Lithiumsalz (Tab. 1, Zeile 1). Die schlechte Ausbeute von 12 % führten wir auf die geringe Löslichkeit des NH_4Cl zurück, und dem entsprechend erhielten wir unter Verwendung von NH_4Ac eine im Vergleich bereits sehr gute Ausbeute von 65 % (Tab. 1, Zeile 2). Der Aufwand für die Präparation des LiN_3 , das durch Umfällen aus NaN_3 und LiCl hergestellt werden muss (BRAUER 1975), erschien uns aber Grund genug, die Möglichkeiten der Synthese mit NaN_3 nochmals genauer zu untersuchen. Unter den Phasentransfer-Bedingungen von LeBlanc und Jursic (Tab. 1, Zeilen 3 bis 6) erhielten

wir im originalen System Toluol/Wasser bis zu 43 %, beim Wechsel zu wässrigem Dioxan bis zu 55 % BMT, wobei sich längere Reaktionszeiten bei geringerer Temperatur als vorteilhaft bestätigten. Die Aufarbeitung allerdings, die in allen Fällen durch Zugabe von Wasser und Ansäuern auf pH 2, gefolgt von mehrfachem Extrahieren mit Methylenchlorid, Re-Extraktion der organischen Phasen mit wässriger NaHCO_3 -Lösung und Fällung des Tetrazolderivats aus der wässrigen Phase durch erneutes Ansäuern durchgeführt wurde (s. Abschnitt 7.2.1.1), war durch den Einsatz des Phasentransferkatalysators erschwert, da dieser die Phasentrennung extrem verlangsamte bzw. verhinderte. Ohne HDTMAB führte die geringe Löslichkeit des Natriumazids wiederum zu schlechten Ausbeuten (Tab. 1, Zeile 7). Dieses Problem konnte durch die Zugabe von einfachen Raschigringen und starkes Rühren der Lösung kompensiert werden (Tab. 1, Zeilen 8 bis 10). Die fortwährende mechanische Aktivierung des suspendierten NaN_3 in der Reaktionslösung führte zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung auf bis zu 72 %. Dabei fällt das Produkt bei beschriebener Aufarbeitung als weißes Pulver von so hoher Reinheit an, dass es ohne weitere Reinigungsschritte für die Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden kann, wie durch NMR, MS und Elementaranalyse bestätigt werden konnte (s. Abschnitt 7.2.1.1).

2.1.3 Ergebnisse der RNA-Synthese mit BMT als Aktivator

Bereits erste Kupplungstests mit BMT anstelle von Tetrazol zeigten sehr gute Ergebnisse, die Konzentration von BMT in Acetonitril musste allerdings von nahezu gesättigter Lösung (0.4 M) auf 0.25 M herabgesetzt werden, um Kristallisation in den Schläuchen und Ventilen des Syntheseautomaten zu vermeiden. Bei der vergleichenden Synthese einer 21-mer RNA (RzA, s. **Tab. 10**, S. 98) unter Standardsynthesebedingungen, also 12 Minuten Kupplungszeit und einem 15fachen Überschuss der 2'-O-TBDMS-Phosphoramiditbausteine über die feste Phase, wurden damit Kupplungsausbeuten > 99 % erreicht (photometrische Detektion der abgespaltenen Tritylgruppen). Das Chromatogramm der HPLC-Analyse des Rohprodukts (Abb. 13) zeigt im Vergleich zu dem der Synthese der gleichen RNA unter Tetrazolaktivierung eine deutliche Verstärkung des Haupt- (Produkt-) Peaks bei gleichzeitiger Verringerung der Signale der Abbruchfragmente (mit geringerer Retentionszeit). Nach präparativer Reinigung des 21-mers per HPLC konnte dessen chemische Identität und Reinheit durch enzymatischen Verdau, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ESI-MS nachgewiesen werden (WELZ *et al.* 2000).

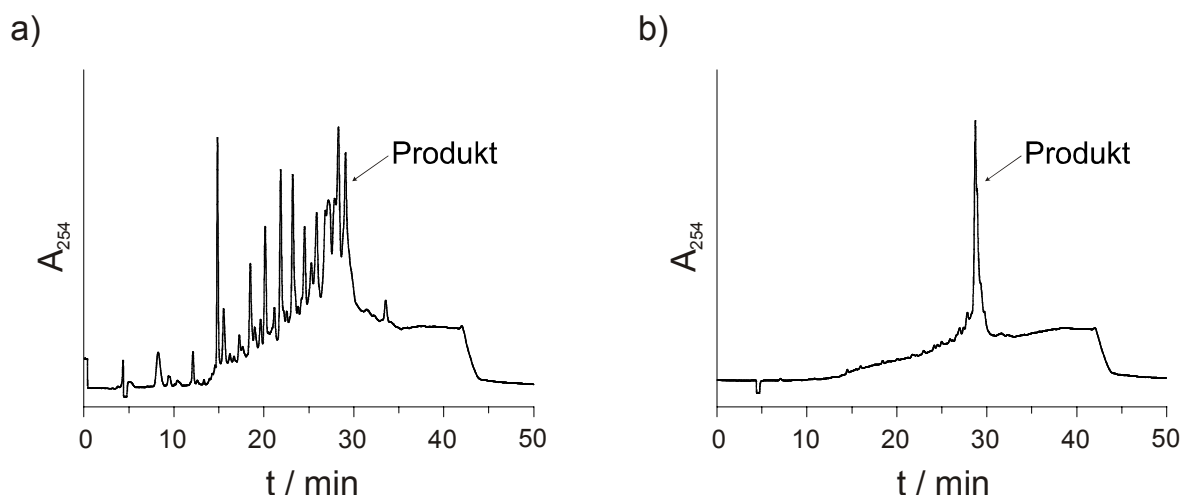


Abb. 13: HPLC-Chromatogramme der Rohprodukte einer 21mer-RNA-Synthese (RzA, s. Tab. 10, S. 98) mit a) 1*H*-Tetrazol und b) 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol als Aktivator.

Weitere Optimierungsversuche zeigten, dass sich bei gleich hohen Ausbeuten die Kupplungszeit von 12 auf 3 min und der Phosphoramiditüberschuss über die Festphase von 15fach auf 8fach reduzieren lässt. Dies macht die Methode äußerst kostengünstig und zeiteffizient verglichen mit der herkömmlichen Variante der Tetrazolaktivierung.

Untersuchungen zum Vergleich der Effektivität der bekannten Aktivierungsreagentien für die RNA-Synthese mit 2'-*O*-TBDMS-Phosphoramiditen zeigten folgende Abstufung: 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol, BMT > 5-(Ethylmercapto)-1*H*-tetrazol, EMT > 4,5-Dicyanoimidazol, DCI > 1*H*-Tetrazol (WELZ und MÜLLER 2002).

Für die Aktivierung der Phosphoramidite sind mechanistisch zwei Eigenschaften der Reagenzien maßgeblich, einerseits die Azidität für die Protonierung des Phosphors und andererseits die Nukleophilie, die den Austausch der Isopropyl- gegen die Tetrazolfunktion bedingt (Abb. 14; DAHL *et al.* 1987, BERNER *et al.* 1989). Die Säurestärke steigt auch in der Reihe Tetrazol ($pK_S = 4.89$) < EMT ($pK_S = 4.28$) < BMT ($pK_S = 4.08$), entsprechend steigendem Aktivierungspotential (LIEBER und ENKOJI 1961). DCI zeigt zwar einen höheren pK_S -Wert (5.2) als Tetrazol, ist aber nukleophiler (Produktinformation von Glen Research, www.glenres.com) und kann in höheren Konzentrationen eingesetzt werden (bis zu 1.1 M). Die Benzylgruppe des BMT führt aber noch zu einem weiteren Vorteil bei der RNA-Synthese. Aufgrund der Lipophilie dieser Gruppe ist BMT weniger hygroskopisch

als die anderen Aktivatoren und lässt sich, einmal getrocknet, wasserfrei in die Synthese einbringen, so dass hydrolytische Nebenreaktionen vermieden werden.

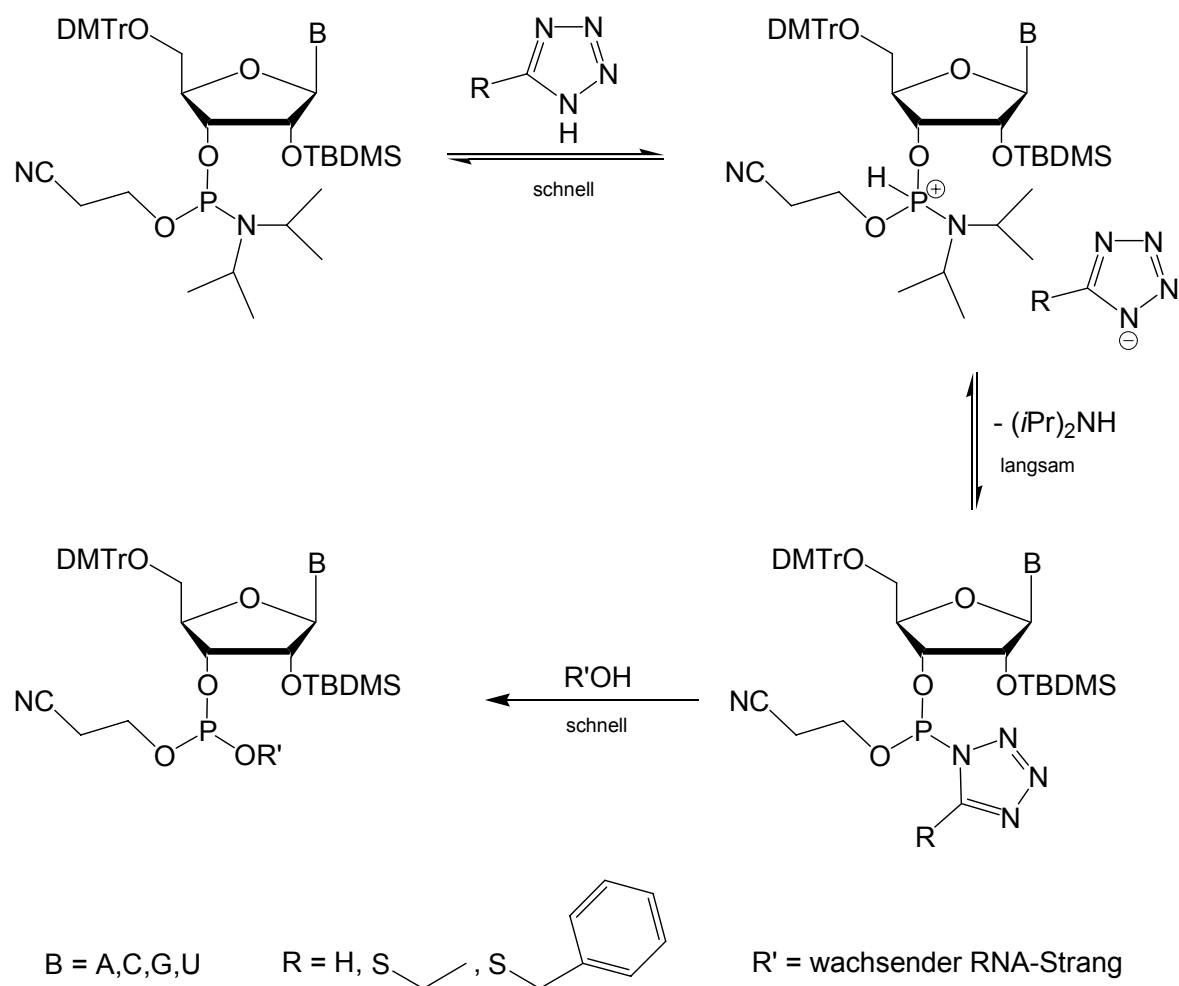


Abb. 14: Aktivierung von Phosphoramiditen durch Tetrazole.

Zusammen mit der einfachen Synthese und Handhabung machen die aufgeführten, sehr guten Eigenschaften 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol zu einem sehr effektiven Aktivator bei der RNA-Synthese mit 2'-*O*-TBDMS-Phosphoramiditen, mit dem höhere Ausbeuten, kürzere Syntheszeiten und die Synthese längerer Oligonukleotide möglich sind.

2.1.4 Reinigung der Oligoribonukleotide

Die Reinigung der kürzeren, chemisch synthetisierten RNAs mit einer Länge bis ca. 30 Nukleotide erfolgte mittels Anionenaustausch-HPLC unter Verwendung starker Anionenaustauscher, speziell einer MonoQ-Säule (Pharmacia) oder einer PL-SAX-Säule (Polymer Laboratories). Dabei wurden die Syntheseprodukte in einem Salzgradienten (KCl oder LiCl) entsprechend ihrer Nettoladung aufgetrennt, so dass zuerst die Abbruchfragmente und zum Schluss die Ziel-RNA eluierten (s. Abschnitt 7.2.1.4, S. 95).

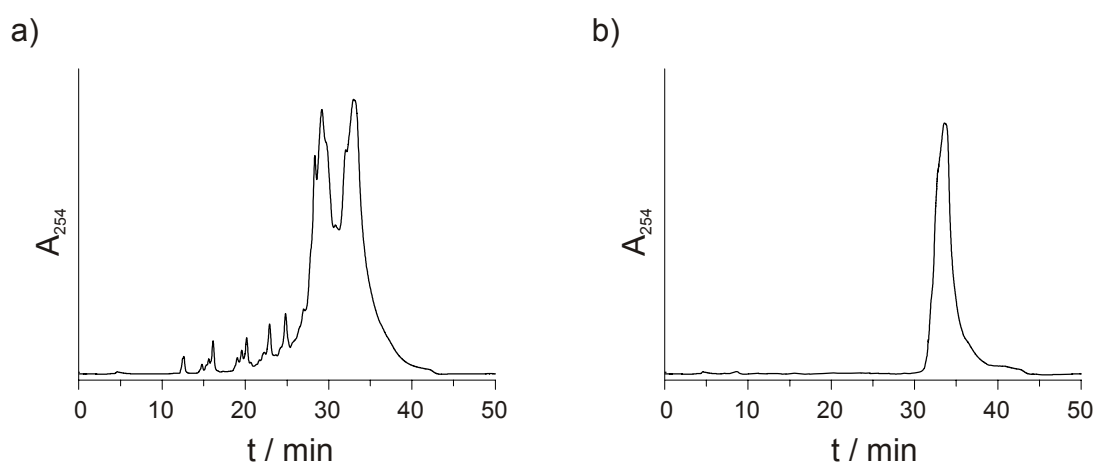


Abb. 15: Analytische Chromatogramme des chemisch synthetisierten 28-mer RNA-Substrates S-TJ-SV2-5'Φ a) vor und b) nach präparativer Auftrennung an einer PL-SAX-Säule (Anionenaustausch-HPLC, s. Abschnitt 7.2.1.4, S. 95).

In Abb. 15 sind exemplarisch die Chromatogramme zweier analytischer HPLC-Läufe vor (a) und nach (b) erfolgter präparativer Auftrennung der 28-mer RNA S-TJ-SV2-5'Φ gezeigt (s. Tab. 10, S. 98). Es handelt sich hierbei um eine Substrat-RNA, der im letzten Syntheseschritt eine 5'-Fluoreszein-Markierung angefügt wurde (s. dazu Kap. 3.1.1). Dies bewirkt eine Vergrößerung der Retentionszeit, und da bei der Markierung kein vollständiger Umsatz erreicht wurde, erklärt sich das Auftreten zweier Hauptpeaks nach einer solchen Prozedur. Nach erfolgreicher Isolierung wurden die Produktfraktionen im Falle Lithiumsalzhaltiger Eluate im Vakuum eingengt und aus 4 M LiCl-Lösung mit Ethanol/Aceton (1:1) gefällt, bei Verwendung von KCl-Gradienten wurde gegen Wasser dialysiert und anschließend zur Trockne lyophilisiert (s. 7.2.1.4).

RNA-Syntheseprodukte mit einer Länge von über 30 Nukleotiden zeigten ungenügende Auflösung der Peaks in den analytischen Chromatogrammen, so dass eine Reinigung per HPLC keine ausreichende Abtrennung der Abbruchfragmente garantierte. Diese längeren Oligoribonukleotide wurden deshalb durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in 10-15%igen Gelen unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) aufgetrennt, die Produktbanden im UV-Licht detektiert und ausgeschnitten, und durch Elution der Gelbanden mit einem wässrigen Natriumacetat-Puffer und anschließende Ethanol-Fällung wurden die gereinigten RNAs isoliert (s. 7.2.4.1).

Eine tabellarische Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten, chemisch synthetisierten RNAs mit den Details zur Synthese und Reinigung findet sich im experimentellen Teil (s. Tab. 10, S. 98).

2.2 Enzymatische RNA-Synthese

Da die chemische RNA-Synthese mit steigender Kettenlänge aufgrund der abnehmenden Ausbeuten ineffizient wird, wurden die relativ langen Ribozymstränge durch enzymatische *in vitro* Transkription hergestellt. Die dafür benötigten DNA-Doppelstränge wurden generiert, indem zwei chemisch synthetisierte, einzelsträngige DNA-Primer, die sich im mittleren Bereich über komplementäre Basenpaarung zusammenlagern, durch eine enzymatische DNA-Auffüllreaktion mit DNA-Polymerase zum Doppelstrang vervollständigt wurden (Abb. 16). Diese Strategie bietet mehrere Vorteile: Einmal erlaubt sie die Verwendung zweier Primer, die deutlich kürzer als der benötigte Doppelstrang sind und deren Synthese und Isolierung dadurch natürlich einfacher gelingt. Zum anderen lassen sich damit verschiedene Primer kombinieren, um Sequenzen in verschiedenen Teilen von Ribozymen auf einfache Weise zu variieren und Rückschlüsse auf Aktivität und mechanistische Aspekte zu erhalten. Nicht zuletzt ist die enzymatische RNA-Synthese sehr kostengünstig, denn bei normalen Doppelstrangauffüllreaktionen erhält man ausreichend dsDNA für mehrere Transkriptionen und typische Transkriptionsansätze liefern bereits Ribozym-Mengen im Bereich von 200 pmol, mit denen ganze Reihen von Ribozym-Aktivitätsstudien durchgeführt werden können (zum Vergleich: chemische RNA-Synthesen erfolgen im 1 µmol-Maßstab mit Ausbeuten von über 100 nmol an gereinigtem Endprodukt).

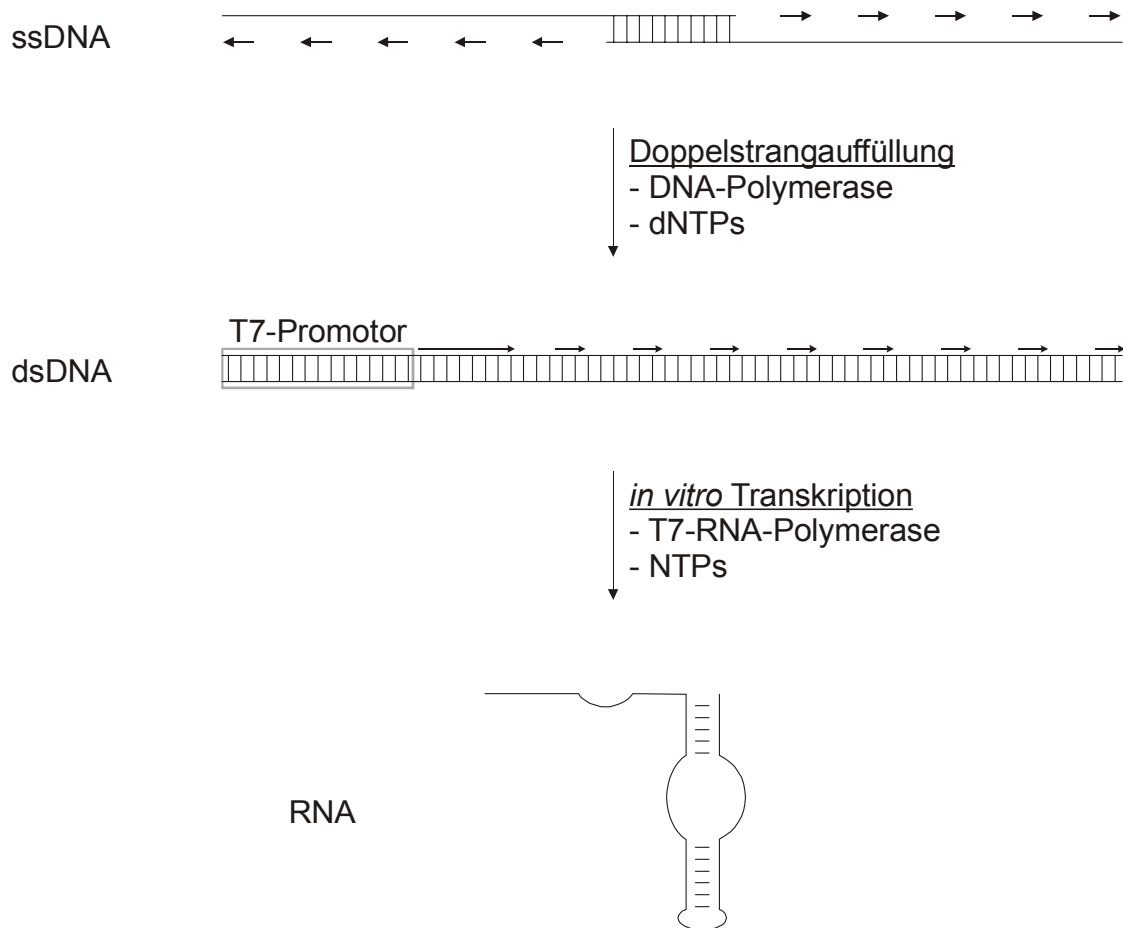


Abb. 16: Schematische Illustration der enzymatischen RNA-Synthese.

2.2.1 Synthese der DNA-Einzel- und Doppelstränge

Die chemische Synthese der DNA-Einzelstränge erfolgte analog der Synthese der RNAs nach dem Phosphoramiditverfahren an fester Phase (s. Abb. 10, S.18), wobei aufgrund der fehlenden 2'-Schutzgruppe bereits bei kürzeren Kupplungszeiten (1-2 min) Ausbeuten > 99 % pro Schritt erreicht werden und damit generell längere Oligonukleotide erhältlich sind (im Vergleich zur RNA-Synthese mit Tetrazolaktivierung). Auch hier ließ sich der Aktivator Tetrazol ohne Probleme und bei gleich bleibenden Ausbeuten durch das kostengünstigere BMT ersetzen. Im Unterschied zur RNA-Synthese entfällt einerseits natürlich die Entschützung der 2'-Gruppen und andererseits die Abspaltung der DMTr-Gruppe nach dem letzten Syntheszyklus, so dass nach Abspaltung der Basenschutzfunktionen nur das Oligonukleotid mit voller Länge eine hydrophobe Gruppe

trägt. Dies ermöglicht die einfache Isolierung der Ziel-DNA mittels HPLC an einer RP18-Säule, wie es exemplarisch in Abb. 17 gezeigt ist. Nach erfolgreicher Auftrennung der Syntheseprodukte im Acetonitril-Gradienten wurden die produkthaltigen Fraktionen im Vakuum eingeeengt und mit 80%iger Essigsäure versetzt, um die DMTr-Gruppe abzuspalten. Diese wurde nach erneutem Einengen durch Essigester-Extraktion entfernt und die DNA aus wässriger Lösung mittels Ethanol gefällt. Da die Preise für synthetische DNAs kommerzieller Anbieter im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit unter unsere eigenen Aufwendungen sanken, wurde ein Teil der benötigten Primer bei der Firma BioTeZ (Berlin/Buch) erworben. Diese Primer wurden bereits HPLC-gereinigt und entsalzt geliefert und konnten sofort für die Herstellung der dsDNAs eingesetzt werden. Eine Auflistung aller verwendeten DNA-Primer findet sich in Tab. 11, S. 102.

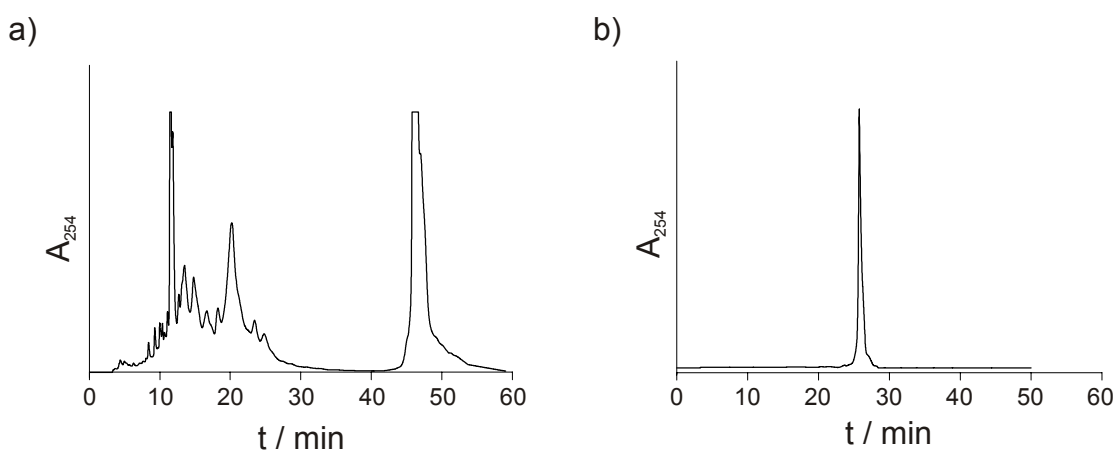


Abb. 17: Chromatogramme a) eines präparativen HPLC-Laufs zur Reinigung eines 37-mer DNA-Primers P2TL (s. Tab. 11, S. 102) mit 5'-DMTr-Gruppe an einer RP18-Säule und b) einer analytischen Probe der gereinigten DNA nach DMTr-Abspaltung (HPLC-Bedingungen s. Abschnitt 7.2.2, S. 99).

Die Synthese der DNA-Doppelstränge erfolgte durch Mischen zweier geeigneter Primer, die sich um 9 bis 36 Basenpaare überlappten. Die Länge der Hybridisierungsregion wurde dabei in Abhängigkeit von der Länge und der Sequenz der Primer gewählt, um den gewünschten Duplex gegenüber unerwünschten komplementären Wechselwirkungen in anderen Sequenzbereichen zu favorisieren. Nach erfolgter Auffüllreaktion mit DNA-Polymerase und dNTPs wurden die DNA-Doppelstränge mittels nativer Gelelektrophorese in 10 bis 20%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (s. Abb. 18), die Produktbanden nach

UV-Detektion ausgeschnitten und mit wässrigem NaOAc-Puffer eluiert. Die Eluate wurden einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, um Verunreinigungen durch Proteine zu vermeiden, und abschließend mit Ethanol gefällt. In einem Standardansatz wurden jeweils 1 nmol Primer eingesetzt und Ausbeuten zwischen 400 und 800 pmol an dsDNA erhalten, was ausreichend für mehrfache Transkriptionsansätze war (s. Abschnitt 2.2.2).

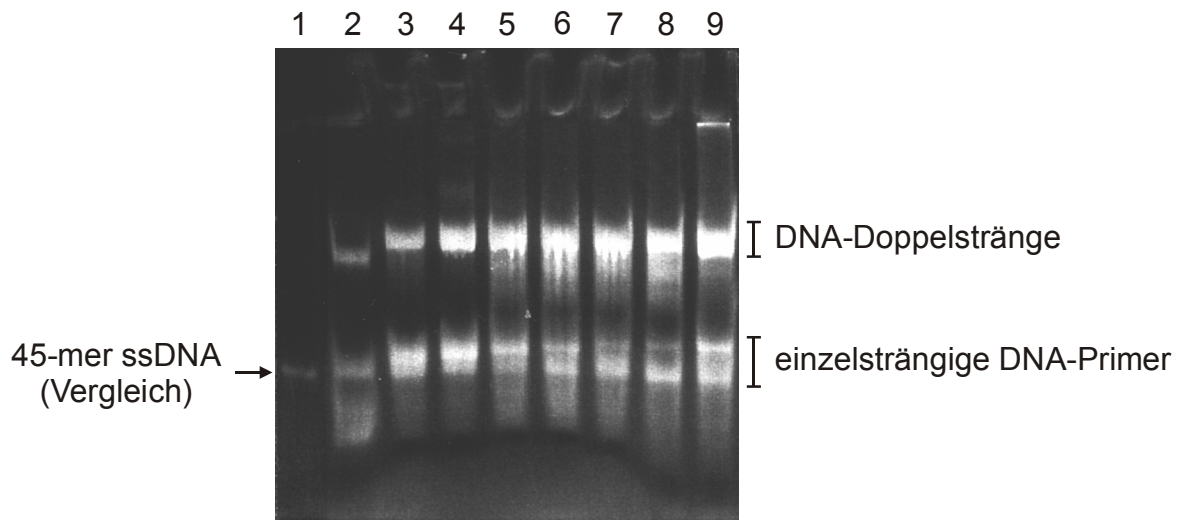


Abb. 18: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Doppelstrangauffüllreaktionen in einem nativen Polyacrylamidgel. Bahn 1: 45-mer Primer P1; Bahn 2: Auffüllreaktion der Primer P1 (45 nt) und P2 (36 nt) zum DNA-Doppelstrang dsWTL (72 bp); Bahn 3: P1 (45 nt) + P2-TJoA (49 nt) zu dsTJoA (85 bp); Bahn 4: P1 (45 nt) + P2-TJ0 (50 nt) zu dsTJ0 (86 bp); Bahn 5: P1 (45 nt) + P2-TJ1 (51 nt) zu dsTJ1 (87 bp); Bahn 6: P1 (45 nt) + P2-TJ2 (52 nt) zu dsTJ2 (88 bp); Bahn 7: P1 (45 nt) + P2-TJ3 (53 nt) zu dsTJ3 (89 bp); Bahn 8: P1 (45 nt) + P2-TJ4 (54 nt) zu dsTJ4 (90 bp); Bahn 9: P1 (45 nt) + P2-TJ5 (55 nt) zu dsTJ5 (91 bp) (für Primersequenzen und experimentelle Bedingungen s. Abschnitt 7.2.2, S. 99).

2.2.2 *In vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Für die Transkription einer DNA-Matrize mit T7-RNA-Polymerase muss ein doppelsträngiger, 17 Basenpaare umfassender Promotor vorhanden sein, der dem Enzym als Erkennungs- und Kontaktsequenz dient. Außerdem ist die Effektivität der Transkription stark von der Sequenz der nächstfolgenden 5-6 Nukleotide abhängig; als optimal hat sich

hier die Abfolge GGGAGA erwiesen (MILLIGAN und UHLENBECK 1989). Deshalb wurde diese Startsequenz in allen Fällen zwischen Promotor und Ribozym eingefügt, so dass alle transkribierten Ribozyme diese 6 Nukleotide am 5'-Ende tragen. Diese stören die Ribozymaktivität in keiner Weise und wurden teilweise in das experimentelle Design einbezogen.

Für einen typischen Transkriptionsansatz wurden 50 pmol dsDNA-Matrize mit NTPs und T7-RNA-Polymerase inkubiert (Kap. 7.2.3.3, S. 101). Die Isolierung der Produkt-RNAs erfolgte über denaturierende PAGE in 10- bis 20%igen Gelen (Abb. 19), die Produktbanden wurden im UV-Licht detektiert, ausgeschnitten und mit Puffer eluiert, sowie abschließend mit Ethanol aus den Eluaten gefällt. Auf diese Weise wurden pro Ansatz ca. 100 bis 400 pmol Ribozym erhalten, die in wässriger Lösung bei -20 °C gelagert wurden. Alle so gewonnenen RNAs sind in Tab. 12, S. 103 aufgeführt.

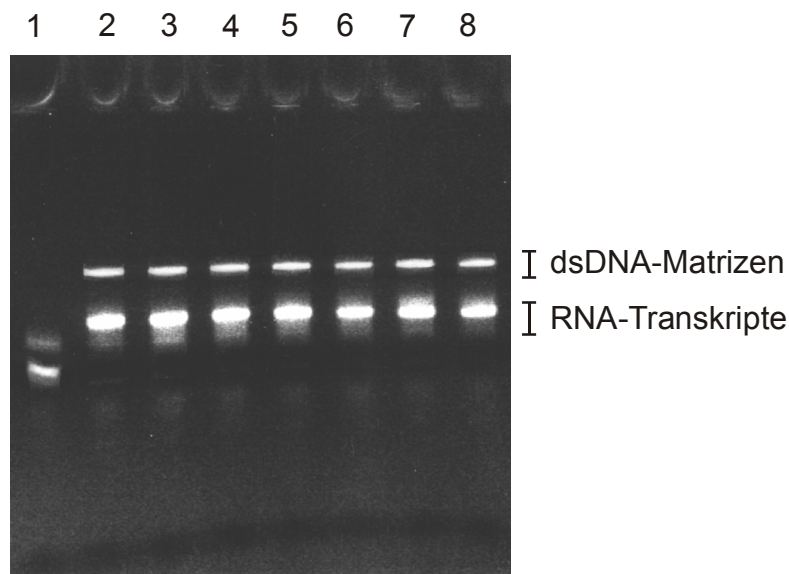


Abb. 19: Reinigung der von den Doppelsträngen in Abb. 17 transkribierten RNAs in einem 20%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Bahn 1: HP-WTL (55 nt); Bahn 2: HP-TJoA (68 nt); Bahn 3: HP-TJ₀ (69 nt); Bahn 4: HP-TJ₁ (70 nt); Bahn 5: HP-TJ₂ (71 nt); Bahn 6: HP-TJ₃ (72 nt); Bahn 7: HP-TJ₄ (73 nt); Bahn 8: HP-TJ₅ (74 nt) (für Sequenzen und experimentelle Bedingungen s. Abschnitt 7.2.3.3, S. 101).

3 Analytik der ribozymkatalysierten Reaktionen

3.1 Der Assay zur Detektion fluoreszeinmarkierter RNAs

Die herkömmliche Methode der radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren mit ^{32}P ist auch in der Ribozymanalytik am weitesten verbreitet. Dazu werden die Substrate beispielsweise mittels T4 Polynukleotidkinase und 5'-(γ - ^{32}P)-ATP endständig markiert, und nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die quantitative Erfassung der Konzentrationen der Substrate und der Spalt- bzw. Ligationsfragmente im Allgemeinen über einen Phosphoimager. Dieses Verfahren weist eine Reihe von Nachteilen auf, von denen die gesundheitsschädliche Wirkung radioaktiver Strahlung und die damit verbundenen hohen Sicherheitsauflagen beim Arbeiten mit solchen Stoffen wohl der schwerwiegendste ist. Außerdem nimmt die Strahlungsleistung der Markerfunktion mit der Zeit ab und die (Sequenzier-) Gele können nur einmal beladen werden, da sie zwecks Detektion zerlegt werden müssen.

In Analogie zu neueren Sequenziertechniken und in Anlehnung an ältere Arbeiten (GLÄSNER *et al.* 1992) verwenden wir fluoreszeinmarkierte RNAs als Substrate und einen DNA-Sequenzierautomaten zur quantitativen Erfassung des Edukt/Produkt-Verhältnisses. Die entscheidenden Vorteile sind die Ungefährlichkeit der Fluoreszenzmarkierung, der Erhalt der Detektierbarkeit über lange Zeiträume (Jahre) und der hohe mögliche Probendurchsatz mit diesem Assay durch Mehrfachbeladung der Sequenziergele.

3.1.1 Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren

Für die Fluoreszenzmarkierung der RNA-Substrate sind Fluoreszeinphosphoramidite kommerziell erhältlich, mit denen das Oligonukleotid bei der Festphasensynthese nach dem Phosphoramiditverfahren markiert werden kann. Dabei lässt sich der in Abb. 20a gezeigte Baustein für die 5'-Markierung verwenden, während das in Abb. 20b gezeigte,

trägergebundene Fluoreszeine für die Markierung am 3'-Ende nutzbar ist. Durch die Verwendung eines Isomerengemischs von 5,6-Carboxyfluoreszein im Falle des 5'-Markers kam es in einigen Fällen zur Auftrennung der Signale der beiden RNA-Spezies mit den unterschiedlichen Fluoreszeinmolekülen während der Gelelektrophorese im Sequenzierautomaten. Die Laufunterschiede sind jedoch deutlich geringer als die zweier RNAs mit einer Längendifferenz von einem Nukleotid, so dass beide Fälle klar voneinander abgegrenzt werden konnten (SCHMIDT 2000).

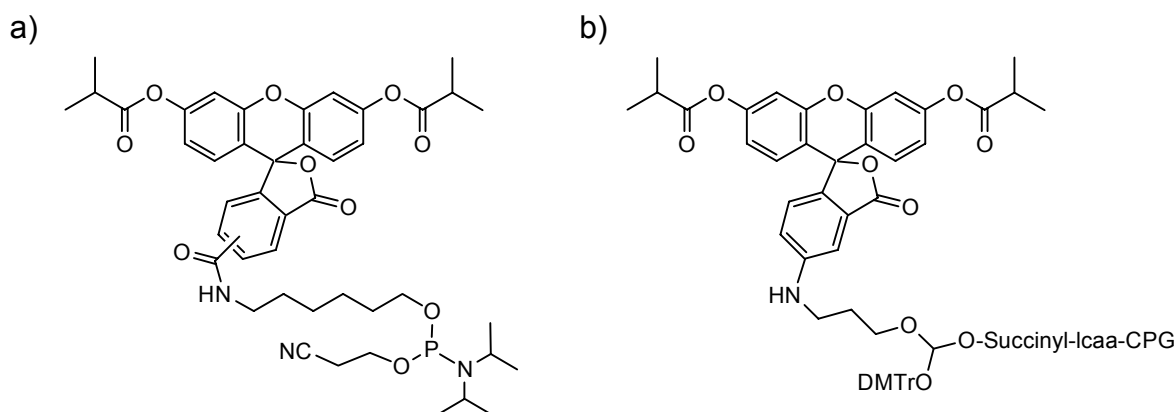


Abb. 20: Kommerzielle Fluoreszeinbausteine für die a) 5'- und b) 3'-Markierung von Oligonukleotiden bei der chemischen Synthese nach dem Phosphoramiditverfahren.

3.1.2 Quantitative Analyse mit einem DNA-Sequenzierautomaten

Fluoreszeinmarkierte Oligonukleotide können mittels eines A.L.F. (Automated Laser Fluorescence) DNA Sequencers (Pharmacia) analysiert werden (Abb. 21). Die Proben werden dabei auf ein 15%iges Polyacrylamidgel mit 40 Bahnen aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Im unteren Viertel des Gels läuft ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm quer zur Laufrichtung durch das Gel, senkrecht dazu sind hinter dem Gel in Höhe des Laserstrahls 40 Photodioden angeordnet. Passiert nun ein fluoreszeinhaltiges Fragment den Laserstrahl, wird ein Signal in den entsprechenden Detektor emittiert, so dass bei kontinuierlicher Aufzeichnung für jede einzelne Bahn eine Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurve entsteht.

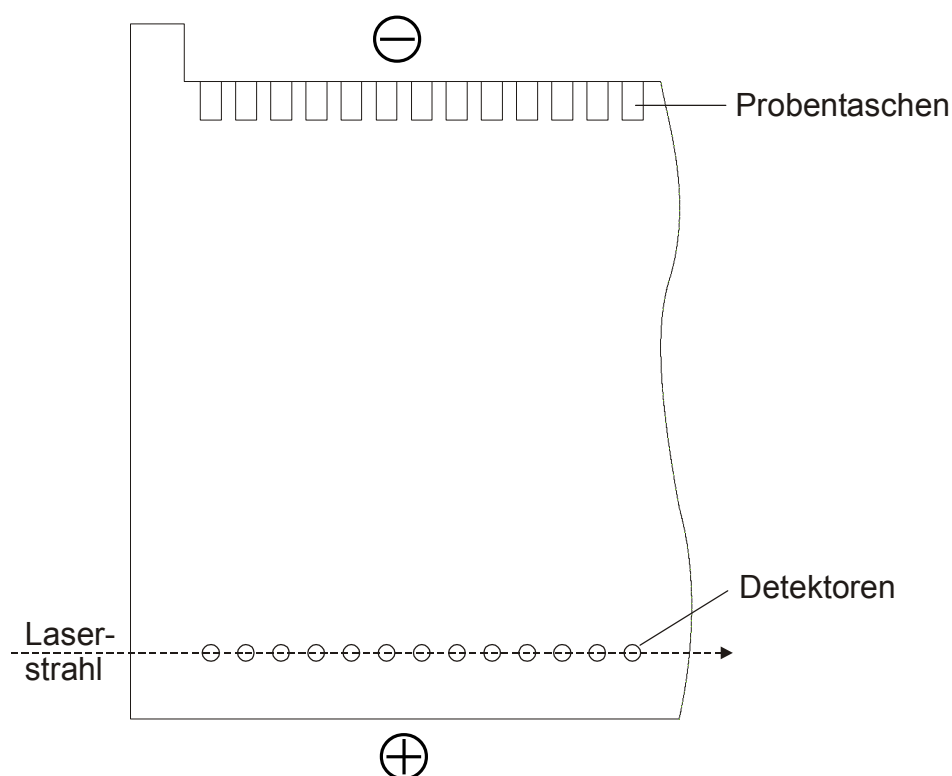


Abb. 21: Detektionsprinzip des A.L.F.-Sequenzierautomaten.

Bei der Reaktion des Ribozyms HP-WTL mit dem 3'-fluoreszeingelabelten 14-mer Substrat S-WT-3'Φ (Abb. 22a; zur Nomenklatur der Ribozyme und Substrate siehe Abkürzungsverzeichnis) wird das Substrat an der mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle in ein unmarkiertes 9-mer und ein markiertes 5-mer gespalten. Trägt man in unterschiedlichen Gelbahnen Proben auf, die dieser Reaktion nach verschiedenen Zeiten entnommen wurden, so ergibt sich das in Abb. 22b gezeigt Bild. Zuerst passiert das kürzere 9-mer nach 101 Minuten den Laserstrahl, nach 116 Minuten dann das 14-mer Substrat. Mit der zum A.L.F.-Automaten gelieferten Software lassen sich die Peakflächen integrieren und auf 100 % normalisieren, so dass unabhängig von der tatsächlich aufgetragenen Menge an fluoreszentem Material oder Empfindlichkeitsunterschieden zwischen den Detektoren der Anteil an Spaltprodukt ermittelt werden kann. Die Linearität der Abhängigkeit der Peakflächen von der aufgetragenen Menge an markiertem Oligonukleotid wurde experimentell nachgewiesen (MÜLLER 2002). Eine typische primäre Spaltkurve, also die Auftragung des prozentualen Anteils an geschnittenem Substrat gegen

die Zeit, ist in Abb. 22c gezeigt. Die prozentualen Werte lassen sich mit der Ausgangskonzentration des Substrats in umgesetzte Stoffmengen umrechnen.

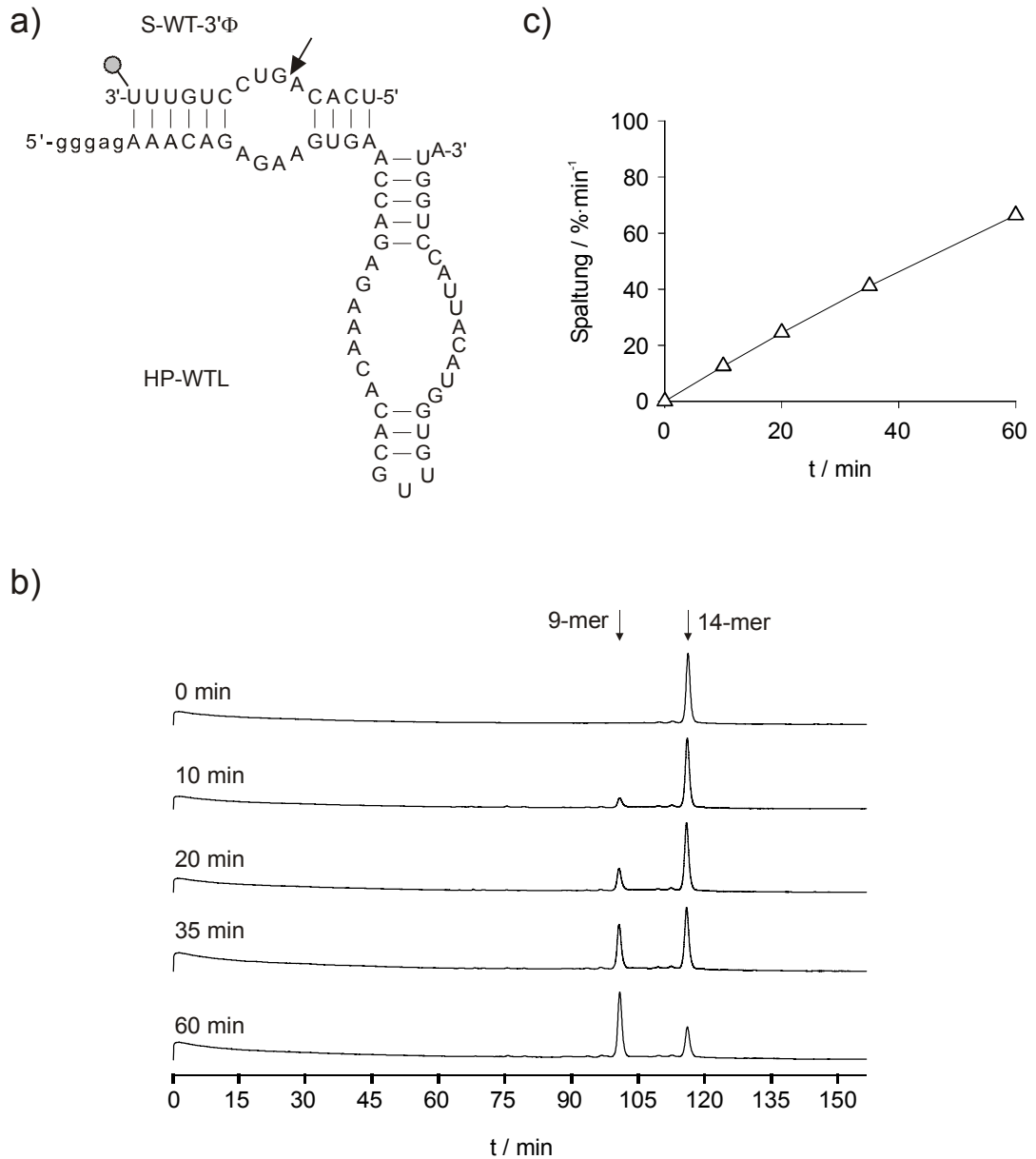


Abb. 22: Rohdaten (b) und daraus gewonnene Zeitabhängigkeitskurve (c) der Reaktion des Hairpinribozyms HP-WTL mit einem 3'-fluoreszenzmarkiertem Substrat (a).

3.2 Kinetische Charakterisierung der Ribozymreaktionen

Generell lassen sich kinetische Parameter entweder unter Substratüberschuss relativ zum Ribozym (*multiple turnover*) oder unter Ribozymüberschuss relativ zum Substrat (*single turnover*) bestimmen.

Da es sich beim Hairpinribozym um ein echtes Enzym handelt, welches Substrate unter mehrfachem Umsatz spaltet, lassen sich unter Bedingungen mit Substratüberschuss die typischen Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmen, also k_{cat} als Größe für die Reaktionsgeschwindigkeit bei unendlichem Substratüberschuss (auch „*turnover* Zahl“) und die Michaelis-Menten-Konstante K_M , die in Abhängigkeit vom Verhältnis mehrerer Geschwindigkeitskonstanten als Ausdruck für die Substratspezifität oder als Dissoziationskonstante des Ribozym-Substrat-Komplexes betrachtet werden kann (Herleitungen dieser Ausdrücke finden sich in Biochemie-Lehrbüchern, z.B. LEHNINGER 2001):

$$k_{obs} = \frac{k_{cat}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Dabei ist $[S]$ die Substratausgangskonzentration, deren Änderung aufgrund des großen Überschusses gegenüber dem Ribozym vernachlässigbar ist, und k_{obs} die durch die Ribozymkonzentration $[E]$ geteilte Reaktionsgeschwindigkeit v :

$$k_{obs} = \frac{v}{[E]}; \quad k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]} \quad (2)$$

Umformen der Gleichung (1) ergibt die Eadie-Hofstee-Darstellung:

$$k_{obs} = -\frac{k_{obs}}{[S]} K_M + k_{cat} \quad (3)$$

mit deren Hilfe man grafisch die kinetischen Parameter ermitteln kann. Dazu wurden mindestens 6 verschiedene Reaktionen mit einer Substratkonzentration zwischen 30 und 200 nM und einer Ribozymkonzentration von 3 bis 20 nM über die ersten 15 Minuten verfolgt, um die Anfangsgeschwindigkeiten zu bestimmen (s. 7.2.6, Reaktion I, S. 109). Die daraus ermittelten k_{obs} -Werte wurden gegen $k_{obs}/[S]$ aufgetragen und entsprechend Gleichung (3) ergab sich durch Extrapolation auf unendliche Substratkonzentration ($k_{obs}/[S]$ gegen 0) k_{cat} als Achsenabschnitt auf der y-Achse und K_M als negativer Anstieg. Durch computergestützte Auswertung sind die gleichen Parameter aber auch direkt aus der Michaelis-Menten-Kurve erhältlich (Abb. 23a).

In Analogie zu den Michaelis-Menten Bedingungen lassen sich *single turnover* Parameter bestimmen:

$$k_{obs} = \frac{k_{react}[E]}{K_1 + [E]} \quad (4)$$

Der bedeutsame Unterschied liegt in der Tatsache, dass hier das Ribozym im großen Überschuss vorliegt, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit beispielsweise nicht mehr von vor- oder nachgelagerten Diffusions-, Assoziations- und Dissoziationsgleichgewichten beeinflusst wird, die bei mehrfachem Substratumsatz eine Rolle spielen. Demgemäß entspricht k_{react} der tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes (gegebenenfalls mehrerer Schritte) und K_1 ist die Dissoziationskonstante des Ribozym-Substrat-Komplexes. Entsprechend gilt:

$$k_{obs} = \frac{v}{[S]}; \quad k_{react} = \frac{v_{max}}{[S]}, \quad (5)$$

und für die grafische Auswertung:

$$k_{obs} = -\frac{k_{obs}}{[E]} K_1 + k_{react} \quad (6)$$

Für *single turnover* Kinetiken wurde das Substrat 10 nM eingesetzt und die Ribozymkonzentration von 100 bis 300 nM variiert, die Ermittlung von k_{react} und K_1 erfolgte aus einer der Eadie-Hofstee-Darstellung analogen Auftragung (Abb. 23b).

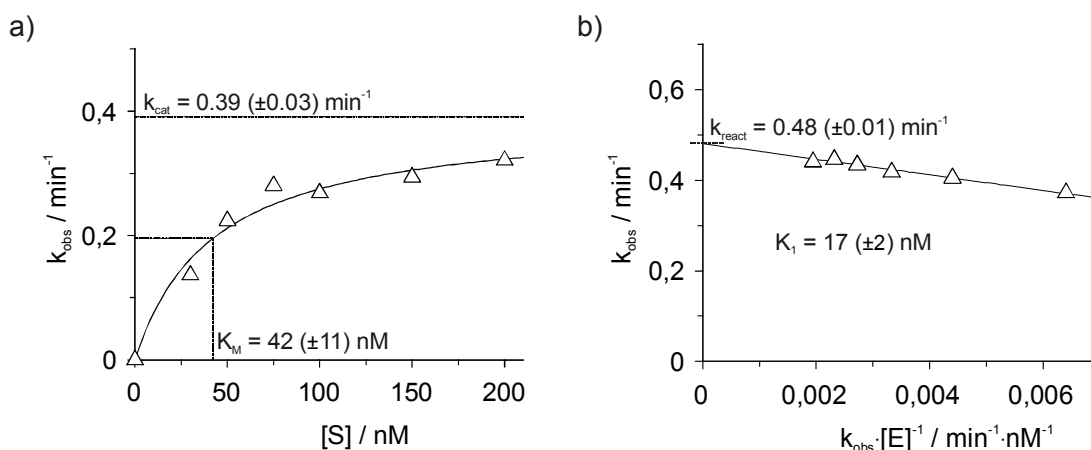


Abb. 23: Beispiele für die (computergestützte) grafische Ermittlung kinetischer Parameter für das System HP-WTTLH4/S-WT-5'Φ a) unter Substratüberschussbedingungen (*multiple turnover*) aus der Michaelis-Menten-Kurve und b) unter Ribozymüberschussbedingungen (*single turnover*) aus einer Eadie-Hofstee-analogen Auftragung.

Die auf diese Weise bestimmten kinetischen Konstanten zeigen zum einen die Übereinstimmung der Werte bei 3'- und 5'-Markierung der Substrate, und zum anderen sind sie mit den Parametern vergleichbar, die mit radioaktiv markierten Substraten bestimmt wurden (Tab. 2). Daraus lässt sich ableiten, dass die verwendete Fluoreszenzmethode für die kinetische Analyse der Spaltreaktionen geeignet ist.

Tab. 2: Kinetische Daten der Substratspaltung durch Hairpinribozyme unter *multiple turnover* Bedingungen.

| Ribozym | Substrat | $k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1}$ | K_{M} / nM |
|---------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| HP-WTL | S-WT-5' Φ | 0.22 ± 0.02 | 33 ± 10 |
| HP-WTL | S-WT-3' Φ | 0.18 ± 0.01 | 19 ± 6 |
| HP-WT | S-WT- ^{32}P | $0.23 \pm 0.01^{\text{a}}$ | $20 \pm 10^{\text{a}}$ |

^a Werte aus SCHMIDT *et al.* 1996

4 Design der Einzelmotive für ein tandemkonfiguriertes Twinribozym

4.1 RNAs mit *three-way junction*

Für die Konstruktion eines Twinribozyms in Tandemkonfiguration war es notwendig, eine zusätzliche, verbindende Helix in einer Weise einzuführen, die die Aktivität des Einzelribozyms möglichst wenig beeinträchtigt bzw. sogar erhöht. Das dabei entstehende Strukturelement einer *three-way junction* (3WJ, s. Abb. 24a), einer Kreuzung von 3 Helices, ist auch in natürlichen DNAs und RNAs anzutreffen und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei molekularen Umlagerungen und bei der Faltung in biologisch aktive Konformationen (STÜHMEIER *et al.* 1997).

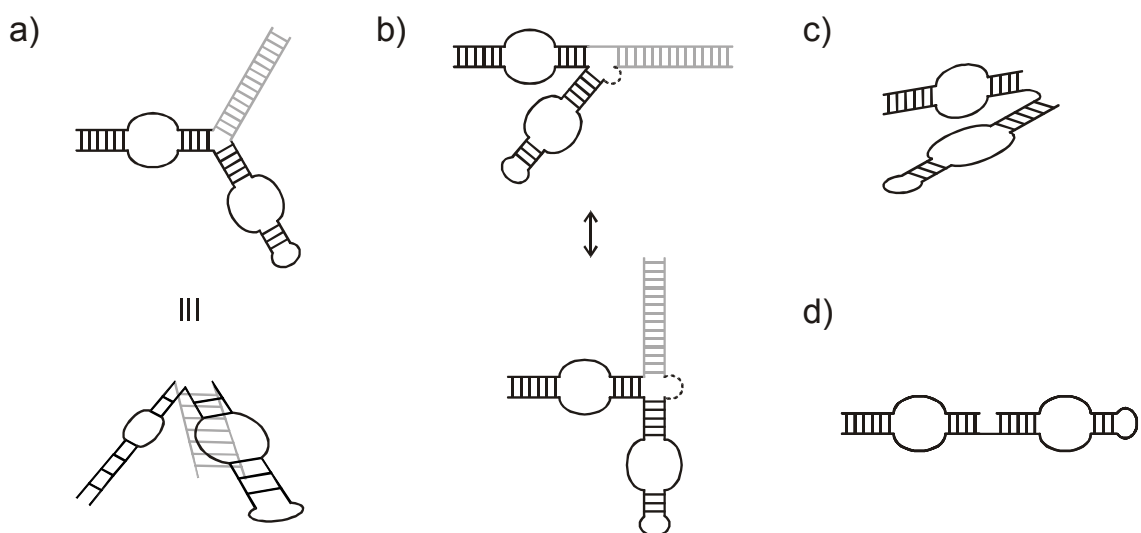


Abb. 24: Aus DNA-Strukturen abgeleitete Konformationen für Hairpinribozyme mit *three-way junction* (zusätzliche Helix in grau) ohne (a) und mit Linker (b) zwischen zwei Armen (gepunktete Linie), und die aktive gefaltete (c) sowie die inaktive gestreckte Form (d) des zweiarmigen Hairpinribozyms.

Eingehende strukturelle Untersuchungen für solche 3WJs wurden bisher nur für DNAs durchgeführt, die Ergebnisse sollten aber die Grundlage für die Generierung eines Hairpinribozyms mit drei Armen sein und sind in Abb. 24 auf diesen Fall übertragen worden. Es stellte sich heraus, dass die Faltung von DNA-3WJs vor allem durch lineares *stacking* (Nukleobasenpaarstapelung) zweier Arme und durch sterische und elektrostatische Abstoßung bestimmt wird und von der Salzkonzentration und der Sequenz der beteiligten Stränge abhängt (WELCH *et al.* 1995). Bei 3WJs ohne einen Linker zwischen zwei Armen sind alle drei Helices in gleichen Winkeln voneinander entfernt, es gibt kein *stacking* zweier Arme, jedoch ist die Struktur nicht planar, sondern wie eine Pyramide abgewinkelt (Abb. 24a). Mit einem Linker gewinnt die Struktur an Flexibilität und infolge dessen tritt ein *stacking* zweier Arme auf und der dritte Arm wird vom Linker weggedrückt (Abb. 24b). Beim Hairpinribozym ist die Aktivkonformation nun durch ein Zusammenklappen von Domäne A und B gekennzeichnet (Abb. 24c), während die gestreckte, inaktive Form durch *stacking* der beiden verbundenen Helices stabilisiert wird (Abb. 24d). Demnach sollte die Einführung eines dritten Arms durchaus vorteilhaft sein, denn sowohl ohne als auch mit Linker wird das ungünstige *stacking* der beiden Ribozymdomänen verhindert. Allerdings setzt die Faltung der beiden katalytischen Domänen des Hairpinribozyms in die Aktivkonformation eine gewisse strukturelle Flexibilität voraus, die bei kurzen Linkern möglicherweise nicht gegeben ist. Bei welcher Linkerlänge das Optimum für die Spalt- und Ligationsaktivität liegt, sollte deshalb experimentell ermittelt werden.

4.2 Untersuchungen zur Spaltaktivität von Hairpinribozymen mit *three-way junction*

Um den Einfluß der Linkerlänge auf die Spaltaktivität des Konstrukts zu bestimmen, wurden mittels *in vitro* Transkription die *three-way junction* Ribozyme HP-TJ_n synthetisiert (Abb. 25). Entsprechend den Schlussfolgerungen des letzten Kapitels war es möglich, den Linker entweder zwischen Helix 2 und Helix 5 (im Substrat) oder aber zwischen Helix 3 und Helix 5 (im Ribozym) einzufügen, um die korrekte Zusammenlagerung der Domänen A und B zu begünstigen. Einfache dreisträngige 3WJ-

Hairpinribozyme mit und ohne einen Linker aus 5 Adenosinresten im Substratstrang, die dem ersten Fall entsprechen, wurden erfolgreich von der Arbeitsgruppe um Ohtsuka auf Schnittaktivität getestet (KOMATSU *et al.* 1997).

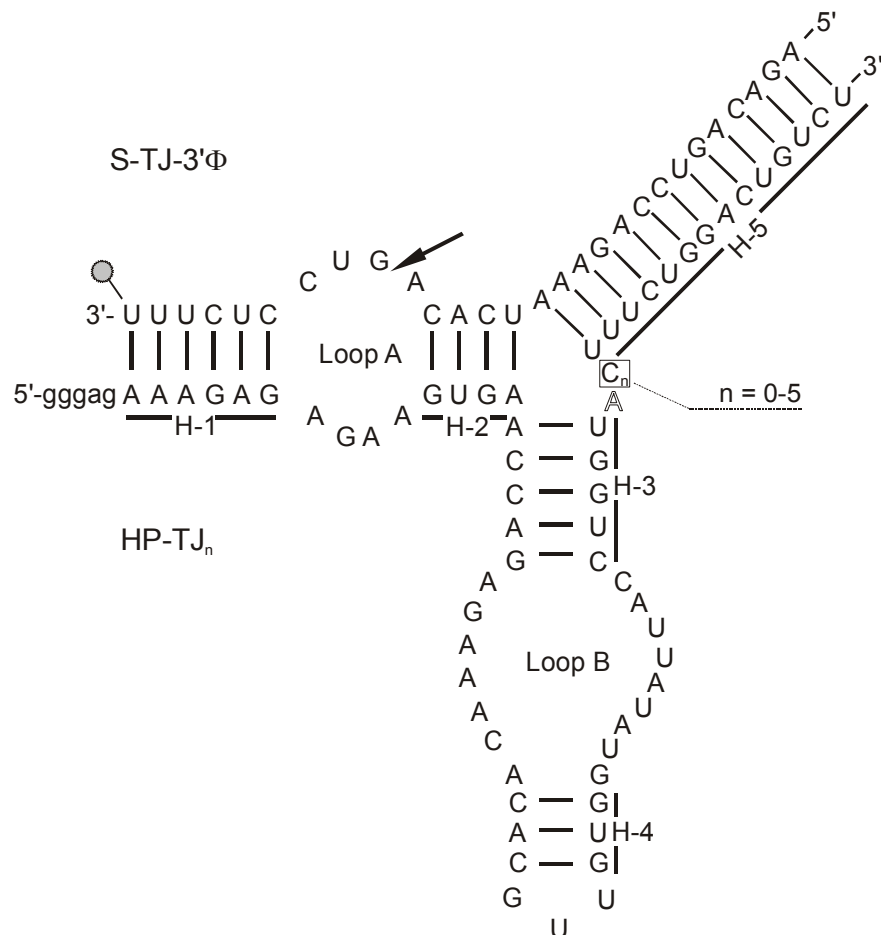


Abb. 25: Sekundärstruktur der three-way junction Ribozyme HP-TJ_n im Komplex mit dem 3'-fluoreszeinmarkiertem 28-mer Substrat S-TJ-3'Φ. Der Pfeil markiert die Spaltstelle, kleine Buchstaben repräsentieren die Optimierungssequenz für die *in vitro* Transkription. Die Nummerierung der Helices 1 bis 4 entspricht der Minimalform des Hairpinribozyms (s. Abb. 4), die neu eingeführte Helix erhielt die Nummer 5.

In der vorliegenden Arbeit wurde der zweite Fall gewählt, weil die Variation der Linkerlänge über die enzymatische Ribozynthese kostengünstiger ist und weil es strategisch vorteilhaft erschien, auf diese Weise die Flexibilität des Ribozymteils in einem zukünftigen Twinribozym zu erhöhen. Infolgedessen konnte in allen Fällen mit einem

28-mer Substrat gearbeitet werden, das im Falle der Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Spaltreaktion 3'-fluoreszeinmarkiert war (Abb. 25). Als Linker wurden Cytidine eingefügt, deren Anzahl von 0 bis 5 variiert wurde. Zusätzlich wurde ein Ribozym HP-TJoA („ohne A“) synthetisiert, dem das Adenosin fehlt, das bei der Minimalform immer am 3'-Ende des Ribozymteils ungepaart vorliegt (s. z. B. Abb. 5, S. 10), und das zwecks Vergleichbarkeit in allen anderen Ribozymen erhalten blieb. Dieses Ribozym HP-TJoA entspricht einer Kreuzung dreier voll gepaarter Helices, wie es in Abb. 24a dargestellt ist.

Für alle Ribozyme mit *three-way junction* wurden die kinetischen Parameter sowohl unter *multiple* als auch unter *single turnover* Bedingungen ermittelt (Tab. 3 und Tab. 4, experimentelle Bedingungen s. Abschnitt 7.2.6, S. 109, Reaktionen I und II) und mit denen der Spaltreaktionen von HP-WTL verglichen.

Tab. 3: Vergleich der kinetischen Daten der HP-TJ_n-Ribozyme unter *multiple turnover* Bedingungen.

| Ribozym | Substrat | K _M [nM] | k _{cat} [min ⁻¹] | k _{cat} / K _M (rel.) |
|--------------------|----------|---------------------|---------------------------------------|--|
| HP-WTL | S-WT-5'Φ | 19 ± 1 | 0.18 ± 0.01 | 1.00 |
| HP-WTL | S-TJ-3'Φ | 40 ± 3 | 0.35 ± 0.01 | 0.92 |
| HP-TJoA | S-TJ-3'Φ | 205 ± 41 | 0.66 ± 0.11 | 0.34 |
| HP-TJ ₀ | S-TJ-3'Φ | 90 ± 3 | 0.65 ± 0.02 | 0.76 |
| HP-TJ ₁ | S-TJ-3'Φ | 73 ± 9 | 0.53 ± 0.03 | 0.77 |
| HP-TJ ₂ | S-TJ-3'Φ | 176 ± 60 | 0.56 ± 0.09 | 0.34 |
| HP-TJ ₃ | S-TJ-3'Φ | 110 ± 12 | 0.46 ± 0.02 | 0.44 |
| HP-TJ ₄ | S-TJ-3'Φ | 152 ± 2 | 0.46 ± 0.01 | 0.32 |
| HP-TJ ₅ | S-TJ-3'Φ | 83 ± 4 | 0.25 ± 0.01 | 0.32 |

Zunächst war festzustellen, dass sich unter Michaelis-Menten-Bedingungen k_{cat} für HP-WTL allein durch die Verwendung des 28-mer Substrats S-TJ verdoppelt. Dabei handelt es sich um ein auf 5'-Seite um 14 nt verlängertes S-WT, wodurch das Ribozym in die aktive, geknickte Konformation gezwungen wird (Zeilen 1 und 2 in Tab. 3). In gleicher Weise lassen sich die höheren Schnittraten der 3WJ-Ribozyme interpretieren, die mit einer

Vergrößerung der Michaelis-Menten-Konstante K_M einhergehen. Letzteres entspricht einer geringeren Substrataffinität, denn für das Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit ist demzufolge eine höhere Substratkonzentration notwendig. Um beide Effekte (Reaktionsgeschwindigkeit und Substrataffinität) beim Vergleich von Enzymen bzw. Ribozymen einbeziehen zu können, verwendet man den Quotienten aus k_{cat} und K_M zur Beschreibung der katalytischen Effizienz. Diese ist für HP-WTL mit beiden Substraten praktisch gleich, für die 3WJ-Ribozyme deutlich geringer. Es lässt sich jedoch keine eindeutige Abhängigkeit der Parameter von der Linkerlänge feststellen, weshalb auch die Daten unter *single turnover* Bedingungen ermittelt wurden (Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich der kinetischen Daten der HP-TJ_n-Ribozyme unter *single turnover* Bedingungen.

| Ribozym | Substrat | K_1 [nM] | k_{react} [min ⁻¹] | k_{react} / K_1 (rel.) |
|--------------------|----------|------------|----------------------------------|--------------------------|
| HP-WTL | S-WT-5'Φ | 134 ± 40 | 0.54 ± 0.09 | 1.00 |
| HP-WTL | S-TJ-3'Φ | 51 ± 36 | 0.50 ± 0.13 | 2.43 |
| HP-TJoA | S-TJ-3'Φ | 43 ± 8 | 0.35 ± 0.02 | 2.02 |
| HP-TJ ₀ | S-TJ-3'Φ | 43 ± 17 | 0.26 ± 0.03 | 1.50 |
| HP-TJ ₁ | S-TJ-3'Φ | 44 ± 20 | 0.26 ± 0.04 | 1.47 |
| HP-TJ ₂ | S-TJ-3'Φ | 35 ± 19 | 0.21 ± 0.03 | 1.49 |
| HP-TJ ₃ | S-TJ-3'Φ | 23 ± 7 | 0.36 ± 0.02 | 3.88 |
| HP-TJ ₄ | S-TJ-3'Φ | 48 ± 14 | 0.27 ± 0.02 | 1.40 |
| HP-TJ ₅ | S-TJ-3'Φ | 73 ± 36 | 0.22 ± 0.04 | 0.75 |

Hier hebt sich HP-TJ₃ geringfügig aber messbar von den anderen 3WJ-Ribozymen ab, deshalb sollte dieses Ribozym als Basis für alle weiteren Optimierungsarbeiten dienen. Auffällig sind aber auch die geringeren Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu den *multiple turnover* Werten und zu HP-WTL mit beiden Substraten. Geht man davon aus, dass bei Ribozymüberschuss jedes Substratmolekül gebunden vorliegt und die Reaktionsgeschwindigkeit damit nur noch von Konformationsänderungen und dem eigentlichen chemischen Schritt abhängt, sollten die *single turnover* Werte größer oder gleich denen unter *multiple turnover* Bedingungen sein. Dass das nicht der Fall ist, lässt

sich darauf zurückführen, dass mit der stärkeren Bindung des 5'-Produktfragments im Falle der HP-TJ_n/S-TJ-Komplexe (18 Basenpaare) die Rückreaktion, also die Ligation, begünstigt wird, so dass die zu beobachtende Spaltrate vermindert wird (WELZ *et al.* 1999). Zu dem gleichen Schluss kam auch die Arbeitsgruppe um Fedor, die sich eingehend mit dem Spalt- und Ligationsverhalten des Hairpinribozyms beschäftigt hat (DONAHUE *et al.* 2000). Ausgehend von diesen Ergebnissen und im Hinblick auf das Ziel eines Twinribozyms, das sowohl spaltet als auch ligiert, sollte deshalb das Ligationsverhalten der Hairpinribozyme mit *three-way junction* näher untersucht werden.

4.3 Ligationseigenschaften der *three-way junction* Ribozyme

Bei der minimalen Form des Hairpinribozyms sind die Produktfragmente nur über 6 (Helix 1) und 4 Basenpaare (Helix 2) gebunden (Abb. 26a), so dass die Ligation durch die schnelle Ablösung dieser Produkte vom Ribozym nahezu verhindert wird. Erst wenn die Produktbindung durch stabilisierende Faktoren erhöht wird, lässt sich die Ligation experimentell verfolgen. Mit einem Konstrukt, bei dem das 5'-Ende des Substrats über einen Linker an das 3'-Ende des zweiarmligen Ribozyms gebunden und bei der Helix 1 auf 8 Basenpaare verlängert ist (Abb. 26b), wurde die Gleichgewichtskonstante für das interne Gleichgewicht zwischen Ligation und Spaltung K_{eq}^{int} ($= k_{Ligation}/k_{Spaltung}$) zu 2.3 bestimmt, d.h. die Ligation läuft 2.3 mal schneller als die Spaltung ab (NESBITT *et al.* 1999).

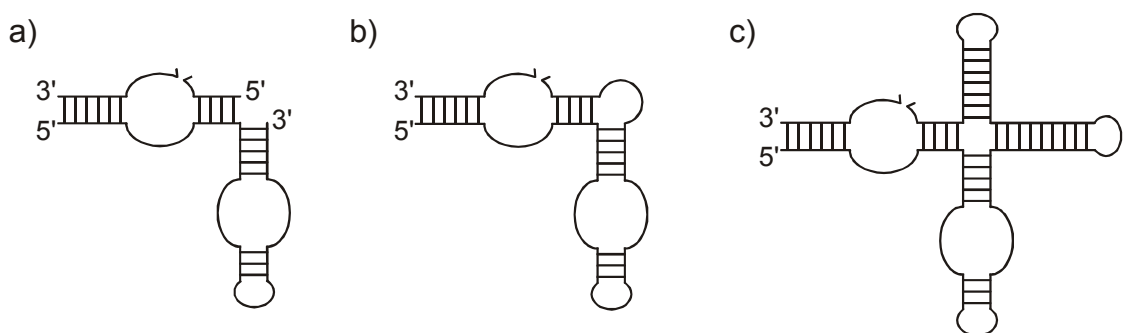


Abb. 26: Schematische Darstellung der Ribozym-Produkt-Komplexe eines minimalen Hairpinribozyms (a), eines speziell für Ligungsuntersuchungen konstruierten Ribozyms (b) und eines *four-way junction* Hairpinribozyms (c).

Bei Verwendung eines *four-way junction* Ribozyms (Abb. 26c), wie es im Genom des *Tobacco Ringspot Virus* vorliegt (s. Abb. 4, S. 9), ist das Gleichgewicht noch weiter zugunsten der Ligation verschoben ($K_{eq}^{int} = 7$), was mit der erhöhten strukturellen Stabilität der Aktivkonformation dieses Ribozyms in Einklang steht (YADAVA *et al.* 2001). Generell wird die Ligation also durch Faktoren begünstigt, die die Stabilität des Ribozym-Substrat- bzw. -Produkt-Komplexes erhöhen (FEDOR 2000).

4.3.1 Untersuchung der Re-Ligation von Fragmenten aus Spaltreaktionen

Die einfachste Möglichkeit für die Stabilisierung der Produktbindung ist die Verringerung der Temperatur. Demzufolge sollte die Absenkung der Reaktionstemperatur nach Erreichen des Gleichgewichts bei der Spaltreaktion dazu führen, dass bereits entstandene Reaktionsprodukte wieder zum Eduktstrang ligiert werden. Zur Unterscheidung von der eigentlichen Ligation, bei der nur die Spaltprodukte eingesetzt werden, wurde diese Art der Reaktionführung „Re-Ligation“ genannt. Wie erwartet zeigten die 3WJ-Ribozyme genau dieses Verhalten, das exemplarisch für HP-TJ₃ in Abb. 27a dargestellt ist.

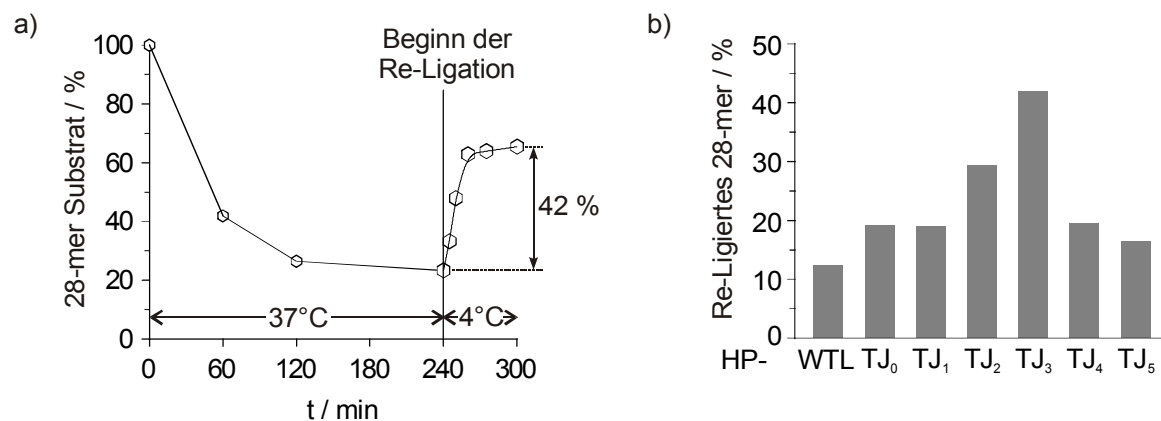


Abb. 27: a) Zeitverlauf der Spaltung (bei 37 °C) und Re-Ligation (bei 4 °C) von S-TJ-5'Φ durch HP-TJ₃; b) Vergleich des Re-Ligationvermögens der getesteten *three-way junction* Ribozyme anhand des prozentualen Anteils an re-ligiertem Produkt nach 60 min.

Dazu wurden 100 nM S-TJ-5' Φ und 100 nM Ribozym unter Standardbedingungen inkubiert (Kap. 7.2.8, S. 114, Reaktion i)². Zuerst erfolgte der Abbau der 28-mer Edukt-RNA zu den Spaltprodukten (9- und 19-mer) bis zum Gleichgewichtswert von 23 % im Falle von HP-TJ₃, und nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf 4 °C erhöhte sich der Anteil des ursprünglichen Substratstranges wieder auf 65 %. Das entspricht einem Anteil an re-ligiertem Produkt von 42 %. In Abb. 27b sind die in gleicher Weise ermittelten Werte für die verwendeten Ribozyme zusammengestellt, und genau wie beim Vergleich der Spaltaktivitäten ergab sich ein Optimum für HP-TJ₃.

Eine andere Möglichkeit der Beeinflussung der Stabilität von RNA-Duplexen ist die Änderung der Konzentration von Kationen, die die negative Ladung der Phosphatgruppen kompensieren und damit die elektrostatische Abstoßung beider Stränge vermindern. Im Falle der Hairpinribozym-katalysierten Reaktionen sind es unter Standardbedingungen die als Kofaktor zugesetzten Magnesiumionen und die im Puffer enthaltenen Tris-Kationen (protonierte Form des Tris(hydroxymethyl)aminomethans), die diese Rolle übernehmen können.

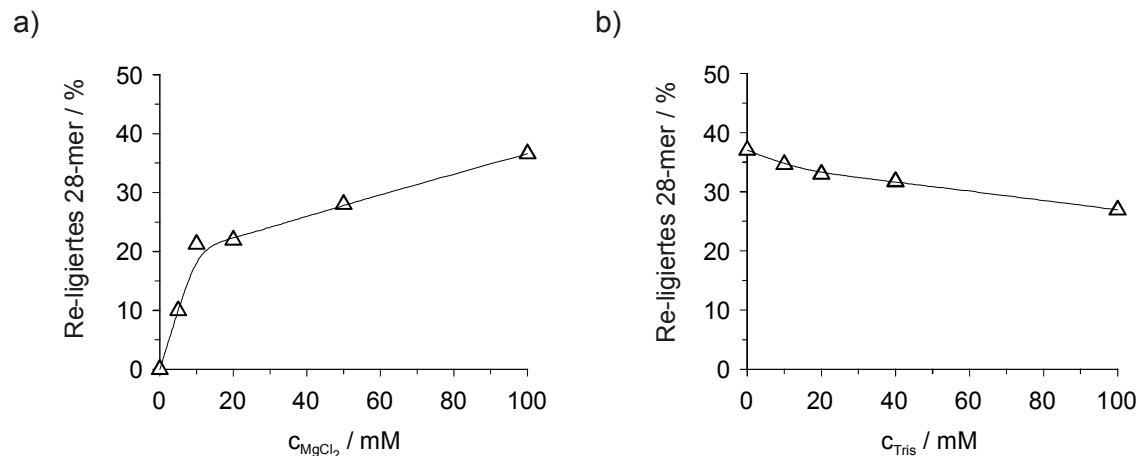


Abb. 28: Abhängigkeit der Re-Ligation von S-TJ durch HP-TJ₃ (je 100 nM) nach 24 h Spaltung bei 37 °C und 30 min Ligation bei 4 °C a) in Abhängigkeit von der MgCl₂-Konzentration und b) in Abhängigkeit von der Tris-HCl-Konzentration (7.2.8, S. 114, Reaktion ii).

² Soweit nicht anders beschrieben sind in dieser Arbeit mit „Standardbedingungen“ für Ribozymreaktionen immer 40 mM Tris-HCl pH 7.5 und 10 mM MgCl₂ sowie 37°C gemeint.

Aus diesem Grunde wurde die Abhängigkeit der Re-Ligation durch HP-TJ₃ von der MgCl₂- und der Tris-Konzentration untersucht. Dazu wurden je 100 nM Ribozym und Substrat S-TJ-5'Φ zuerst 24h bei 37 °C und anschließend 30 min bei 4 °C inkubiert, wobei zum einen die Tris-Konzentration bei 40 mM gehalten und die MgCl₂-Konzentration von 0 bis 100 mM variiert, zum anderen 10 mM MgCl₂ eingesetzt und die Tris-Konzentration von 0 bis 100 mM geändert wurde. Der Anteil an re-ligiertem Substrat S-TJ steigt mit der MgCl₂-Konzentration (Abb. 28a), wobei eine starke Zunahme bis etwa 10 mM MgCl₂ erkennbar ist, während die Kurve bei größeren Konzentrationen an Mg²⁺-Ionen in einen flacheren Anstieg übergeht. Ein identisches Bild wurde für die Abhängigkeit der Spaltgeschwindigkeit von der MgCl₂-Konzentration gefunden (CHOWRIRA *et al.* 1993). Dabei ist anzumerken, dass nach 24 h bei 37 °C unabhängig von der Spaltgeschwindigkeit in allen Fällen das Gleichgewicht erreicht war, so dass die Spaltraten keinen Einfluss auf den Umfang der Re-Ligation hatten. Vielmehr stieg der Gleichgewichtswert für das verbleibende Ausgangssubstrat bei zunehmender MgCl₂-Konzentration sogar von 8 % auf 17 %, eine weitere Bestätigung dafür, dass mit zunehmender Kofaktorkonzentration die Ligation begünstigt wird.

Eine deutliche Tris-Abhängigkeit der Re-Ligation konnte nicht festgestellt werden (Abb. 28b), allerdings handelt es sich bei der protonierten Tris-Base auch nur um ein einwertiges Kation, dass nicht wie das Mg²⁺-Ion in der Lage ist, Phosphatgruppen verbrückend zu chelatisieren.

4.3.2 Ligationsverhalten des HP-TJ₃-Ribozyms

Wie beschrieben war es für die Re-Ligationsexperimente notwendig, nach der Spaltung des 28-mer Substrats S-TJ bei 37 °C die Temperatur zu senken, um durch stärkere Bindung der Produktfragmente an das Ribozym die Gleichgewichtslage zu verändern und die Ligationsreaktion zu begünstigen. Das Ziel bei der Generierung eines Twinribozyms war aber, den Austausch einer RNA-Sequenz möglichst unter physiologischen Bedingungen, also bei 37 °C, durchführen zu können. Zu diesem Zweck sollte die Temperaturabhängigkeit der Ligation ausgehend von 100 % Spaltfragmenten untersucht werden. Dazu mussten die Spaltprodukte der Schnittreaktion als Substrate bereitgestellt werden. Für das 3'-Fragment war dies mittels chemischer RNA-Synthese möglich, auf diesem Wege wurden die 9-mere 3'-SP-WT und 3'-SP-WT-3'Φ und das 14-mer 3'-SP-

WT+5 hergestellt. 3'-SP-WT+5 ist ein in 3'-Richtung um 5 Nukleotide verlängertes 3'-SP-WT, das zusätzlich die 5 Basen der Optimierungssequenz paart, die sich am 5'-Ende der enzymatisch hergestellten Ribozyme befindet (s. Abb. 29a und Abb. 25). Das 5'-Fragment muss aber für die Ligation am 3'-Ende eine 2',3'-Cyclophosphatgruppe tragen. Der einfachste Weg war, das fluoreszeinmarkierte 19-mer aus einer Spaltreaktion durch Gelelektrophorese zu isolieren. Dafür wurde S-TJ-5' Φ mit HP-TJ₃ in einem präparativen Ansatz unter Standardbedingungen gespalten, anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen und das Präzipitat auf einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abschnitt 7.2.7, S. 113). Das so erhaltene 19-mer 5'-SP-TJ-5' Φ konnte erfolgreich für alle Ligationsexperimente eingesetzt werden.

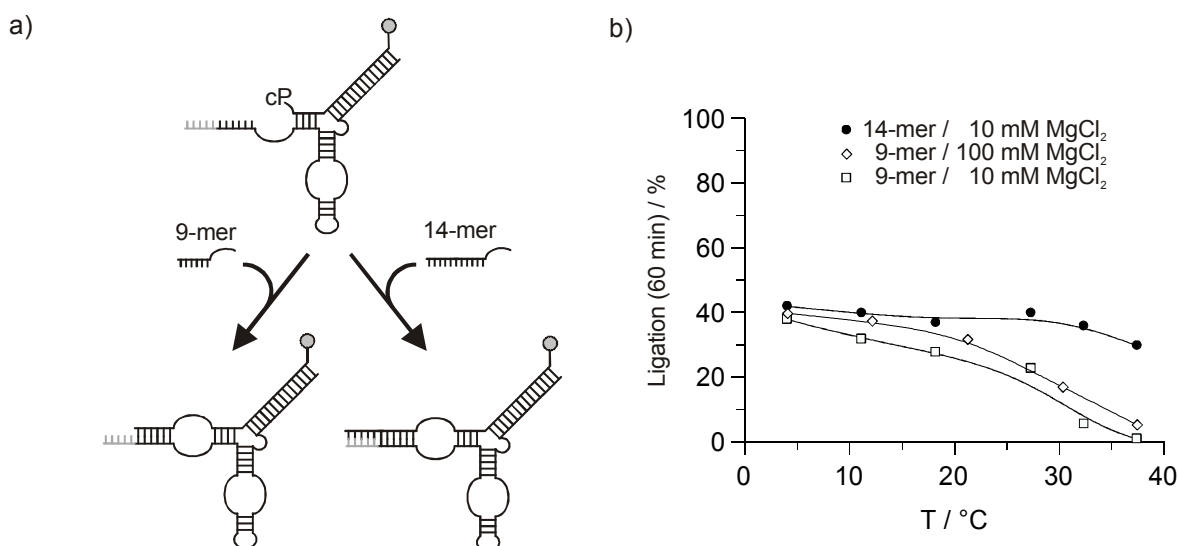


Abb. 29: a) Strukturschema und b) grafische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Ligation von 5'-SP-TJ-5' Φ (19-mer) mit dem 9-mer 3'-SP-WT (□ bei 10 mM MgCl₂ und ◇ bei 100 mM MgCl₂) bzw. dem 14-mer 3'-SP-WT+5 (● bei 10 mM MgCl₂) durch HP-TJ₃. (cP = 2',3'-Cyclophosphatgruppe, grauer Strangbereich = Nukleotide der Optimierungssequenz für die Transkription, s. Abb. 25.)

Für die Ligrationsreaktionen wurde das Ribozym HP-TJ₃ im Standard-Reaktionspuffer vorinkubiert und zum Start der Reaktion wurde ein Gemisch aus 3'- und 5'-Fragment hinzugegeben, so dass alle RNA-Stränge 100 nM vorlagen. In einer ersten Reaktionsreihe

wurde die Ligation von 5'-SP-TJ-5' Φ (19-mer) und 3'-SP-WT (9-mer) unter Zusatz von 10 mM MgCl₂ bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Wie man aus Abb. 29b erkennen kann (Symbol \square), fällt der Wert für den prozentualen Anteil an ligiertem 28-mer kontinuierlich mit zunehmender Temperatur, bei 37 °C liegt er unter 2 %. Zum einen dürfte dies durch eine Verlagerung des internen Gleichgewichts zugunsten der Spaltung mit steigender Temperatur erklärbar sein, wie es für die in Abb. 24b gezeigten Hairpinribozyme gefunden wurde (NESBITT *et al.* 1999). Hauptsächlich dürfte aber die Destabilisierung der fragmentbindenden Doppelstrangbereiche bei Temperaturerhöhung, besonders beim nur über 6 Basenpaare gebundenen 3'-Fragment, dazu beitragen, dass immer weniger ternäre Komplexe für die Ligation zur Verfügung stehen. Letzteres wurde durch zwei weitere Versuchsreihen bestätigt, bei denen die Bindung des 3'-Substratfragments verstärkt wurde. So konnte der Anteil an Ligationsprodukt schon durch die Verwendung von 100 mM MgCl₂ im gesamten untersuchten Temperaturbereich erhöht werden (Abb. 29b, Symbol \diamond), und durch die Verwendung des um 5 Basen längeren 14-mers 3'-SP-WT+5, das mit dem Ribozym eine auf 11 Basenpaare verlängerte Helix 1 bildet, sind selbst bei 37 °C und 10 mM MgCl₂ Ligationsausbeuten von 30 % erhältlich (Abb. 29b, Symbol \bullet). Zum Vergleich seien die Schmelztemperaturen³ T_m angeführt, deren grobe Abschätzung aus empirischen Formeln und Konstanten beispielsweise durch ein im Internet zugängliches Programm möglich ist (www.rnature.com). Damit erhält man folgende T_m -Werte für die Komplexe mit dem Ribozym: 9 °C für 3'-SP-WT bei 10 mM und 17 °C bei 100 mM MgCl₂, sowie 60 °C für 3'-SP-WT+5 bei 10 mM MgCl₂. Diese Zahlen können zwar nur als Richtwerte gelten, stimmen aber qualitativ mit den beobachteten Kurvenverläufen überein und unterstützen die Stabilitätsargumentation. Da die Struktur des geplanten Twinribozyms eine Verlängerung oder Verkürzung der helixbildenden Bereiche sowohl auf 3'- als auch auf 5'-Seite zulässt (s. Abb. 9a, S. 16), sollte es demzufolge später möglich sein, das Spaltungs-Ligations-Gleichgewicht der Doppelribozyme auf diese Weise gezielt zu beeinflussen und an unterschiedliche Bedingungen anzupassen.

³ T_m ist definiert als die Temperatur, bei der 50 % der Doppelstränge komplementärer Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegt.

4.3.3 Versuche zur Bestimmung kinetischer Konstanten für die Ligation

Wie für die Spaltreaktion sollten auch für die Ligation kinetische Konstanten ermittelt werden. Da die Ligationsprodukte stärker an das Ribozym gebunden sind als die Eduktfragmente und das System damit Produktinhibierung aufweist, lassen sich diese Parameter nur für *single turnover* Bedingungen, also Ribozymüberschuss über Substrat, ermitteln. Um die Auswertung der experimentellen Daten möglichst einfach zu halten, wurde nur einer der beiden zu ligierenden RNA-Fragmente als Substrat betrachtet, während der andere Teil, in geeignetem Überschuss zum eigentlichen Ribozymstrang zugesetzt, als zum Ribozym gehörig angesehen wurde (Abb. 30).

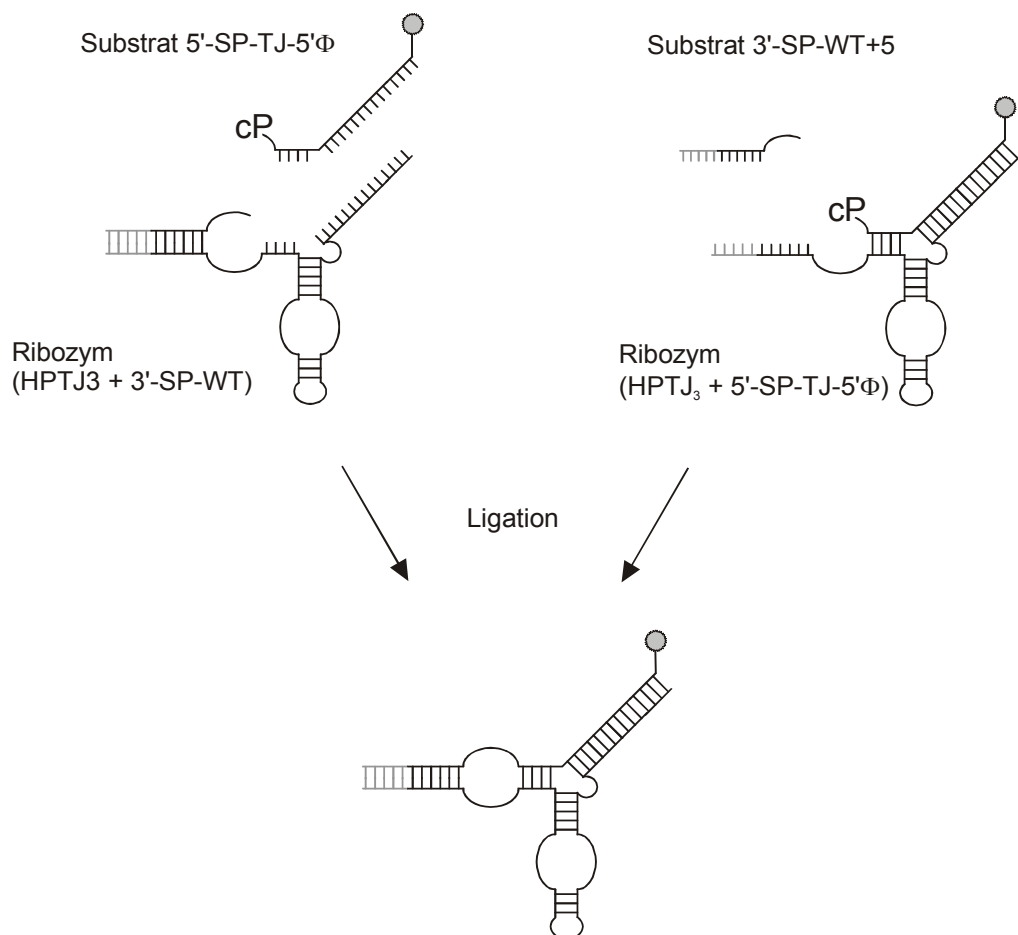


Abb. 30: Zwei Varianten zur Bestimmung der kinetischen Parameter für die Ligation durch HP-TJ₃ unter *single turnover* Bedingungen. Entweder wurden HP-TJ₃ und das 3'-Fragment 3'-SP-WT+5 als Ribozym(komplex) und das 19-mer 5'-SP-TJ-5'Φ als Substrat betrachtet (links), oder der Komplex aus 19-mer und HP-TJ₃ bildete das Ribozym und das 14-mer wurde als Substrat eingesetzt (rechts).

Trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente unter Änderung der Konzentrationen von Ribozymkomplex und Substrat sowie bei verschiedenen Temperaturen wurde bei der Auswertung in keinem Fall ein linearer Zusammenhang gemäß Gleichung 6 (S. 38) festgestellt. Als mögliche Ursachen für die unbefriedigenden Ergebnisse wurden mehrere Faktoren in Betracht gezogen: Zum einen vergrößert die hohe Reaktionsgeschwindigkeit der Ligation die Fehler bei der Probennahme, zum anderen ist die tatsächliche Konzentration an Ribozymkomplex vom Dissoziationsgleichgewicht aus HP-TJ₃ und dem kürzerem der beiden Ligationsfragmente, hier der 3'-Teilstrang, abhängig und kann von den für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} verwendeten Konzentrationen abweichen. Nicht zuletzt nimmt mit zunehmendem Produktanteil auch die Rückreaktion, die Spaltung, Einfluss auf die beobachtete Ligationsgeschwindigkeit (HEGG und FEDOR 1995).

Betrachtet man die in Tab. 5 zusammengestellten kinetischen Parameter für die Ligation durch die Minimalform des Hairpinribozyms, die in der Literatur zu finden sind, so fällt (im Unterschied zur Spaltung) die große Schwankung der Geschwindigkeits-„Konstanten“ auf, die sich teilweise um den Faktor 10 voneinander unterscheiden.

Tab. 5: Vergleich kinetischer Ligationsdaten aus verschiedenen Literaturquellen (Bedingungen: 22/25 °C; 40/50 mM Tris·HCl pH 7.5; 10/12 mM MgCl₂).

| Art der Bestimmung | k_{Ligation} | k_{Spaltung} | $k_{\text{Ligation}} : k_{\text{Spaltung}}$ | Literatur |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|---|----------------------------|
| Radioaktivmarkierung | 3.5 | 0.4 | 8 : 1 | HEGG <i>et al.</i> 1995 |
| Radioaktivmarkierung | 3.0 | 0.2 | 15 : 1 | ESTEBAN <i>et al.</i> 1997 |
| FRET | 1.4 | 0.15 | 9 : 1 | WALTER <i>et al.</i> 1997 |
| Einzelmolekül-FRET | 0.2 ... 0.8 | 0.1 ... 0.2 | 2 : 1 | ZHUANG <i>et al.</i> 2002 |

Die Bestimmung dieser Werte erfolgte mit unterschiedlichen Methoden und unterschiedlichen Ribozymkonstrukten (*in cis* und *in trans* ligierende Formen), und auch die Verfahren der mathematischen Berechnung der Konstanten sind verschieden. Während die Werte von HEGG *et al.* über die Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit von Reaktionen mit variierendem Ribozymüberschuss und anschließende Extrapolation auf unendliche Ribozymkonzentration bestimmt wurden (diese Methode fand auch in dieser

Arbeit für die Messung der Spaltkonstanten Anwendung), wurden die anderen Parameter aus Einzelreaktionen gewonnen, indem der Anteil an ligiertem Produkt gegen die Zeit aufgetragen und die Kurve (im Falle der Einzelmolekül-FRET-Messungen aus vielen Einzelmessungen generiert) mit exponentiellen Geschwindigkeitsgesetzen gefittet wurde. Trotzdem sollten theoretisch alle experimentellen Varianten unter den verwendeten, praktisch übereinstimmenden Reaktionsbedingungen die gleichen Werte liefern. Dass das nicht der Fall ist, zeigt die Schwierigkeit, verlässliche Daten für die Ligationsreaktion zu erhalten. Im Hinblick auf ein Reparaturribozym kam der Ermittlung der Ligationsgeschwindigkeitskonstanten aber eher eine untergeordnete Rolle zu, und aufgrund der beschriebenen Probleme wurde von weiteren Versuchen zur Bestimmung der kinetischen Parameter abgesehen. Bedeutender waren beispielsweise die ermittelten prozentualen Ausbeuten an Ligationsprodukt, die als ausreichend erachtet wurden, oder die Fähigkeit des Hairpinribozyms, RNA-Fragmente gegeneinander auszutauschen, was im Folgenden untersucht werden sollte.

4.3.4 Cross-Ligation: Fragmentaustausch nach Spaltung durch HP-TJ₃

Für das Konzept der Twinribozym-basierten Reparatur einer RNA, also den Austausch eines Sequenzabschnitts, ist die Einzelschrittfolge Spaltung – Fragmentaustausch – Ligation notwendig. Um einen solchen Reaktionsablauf mit dem Einzelmotiv HP-TJ₃ zu testen, wurde ein Cross-Ligations-Experiment durchgeführt. Dazu wurden 200 nM Ribozym und 100 nM Substrat S-TJ-5'Φ bei 37 °C für 1h inkubiert, wobei Spaltung zu fluoreszeinkmarkiertem 19-mer und unmarkiertem 9-mer bis zum Gleichgewicht eintrat (Abb. 31a). Anschließend wurde das 3'-markierte 9-mer 3'-SP-WT-3'Φ im leichtem Überschuss zugesetzt (200 nM) und die Reaktionsmischung auf 6 °C abgekühlt.

Die A.L.F.-Chromatogramme in Abb. 31b zeigen den Verlauf der Ligation nach dem Abkühlen der Reaktion. Zum Zeitpunkt Null sind die Peaks für das 28-mer-Edukt (III), das 19-mer Spaltprodukt (II) und das zugesetzte, markierte 9-mer (I) zu sehen. Mit zunehmender Reaktionsdauer entsteht ein neuer Peak (IV), der dem doppeltmarkiertem 28-mer Ligationsprodukt S-TJ-3'Φ5'Φ zugeordnet werden kann, denn der zusätzliche Fluoreszeinrest bewirkt eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit im Gel.

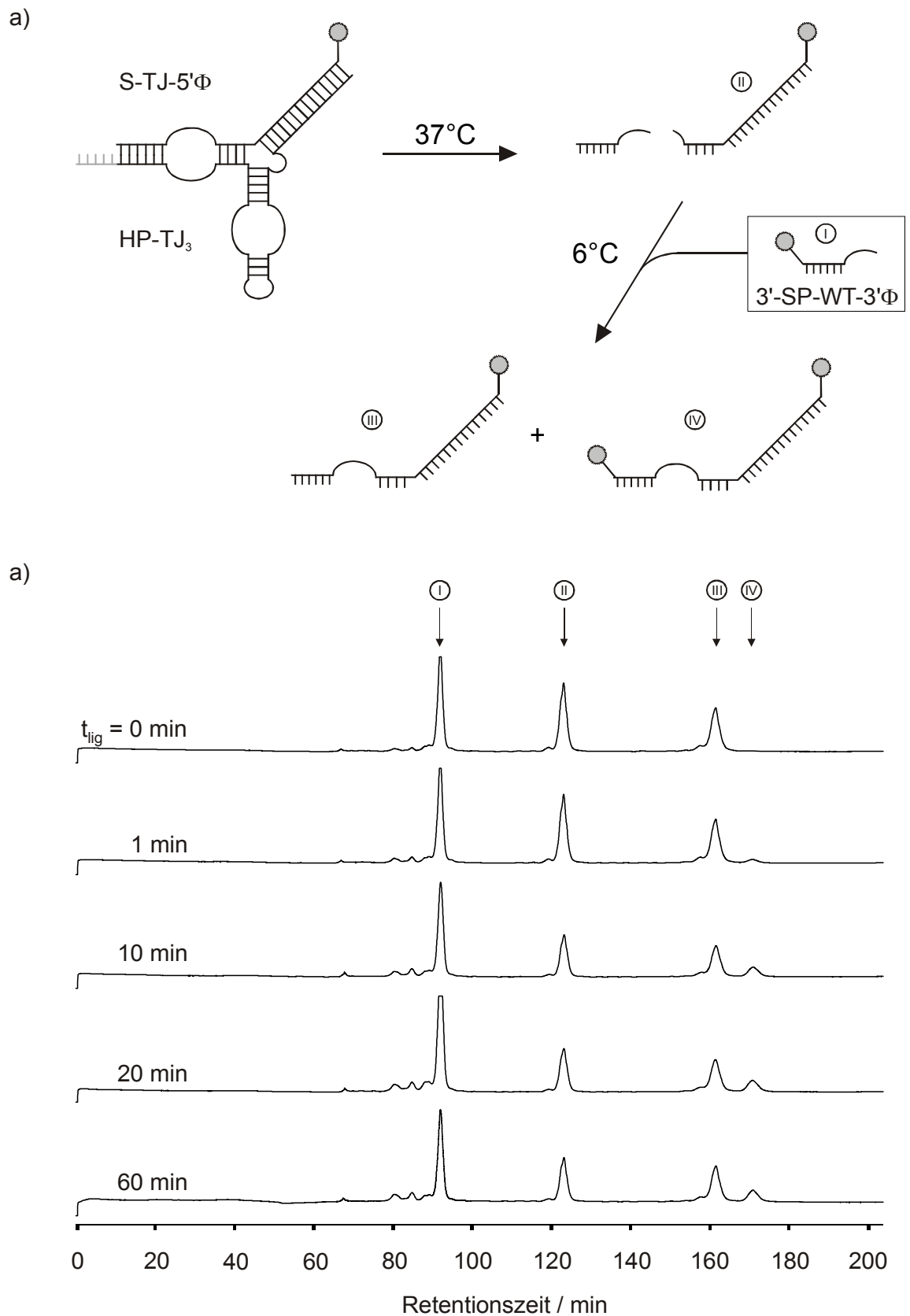


Abb. 31: a) Schematische Darstellung des Ablaufs des Cross-Ligationsexperiments; b) A.L.F.-Rohdaten für die entnommenen Zeitproben nach Zugabe des fluoreszenzmarkierten 9-mers und Temperaturniedrigung auf 6 °C (Ligation).

Damit stand fest, dass das grundlegende Prinzip für die RNA-Reparatur mit Ribozymen des Typs HP-TJ₃ erfolgreich angewendet werden kann. Zwar ist die Reaktionsführung, speziell die Begünstigung der Ligation durch Temperaturniedrigung, kein geeigneter Weg für Anwendungen *in vivo*, also bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Wie aber schon an der erhöhten Ligationsausbeute bei Verwendung des stärker gebundenen 14-mers anstelle des 9-mers zu erkennen war (s. Abb. 29, S. 49), sollten sich über die geeignete Wahl der Sequenz, der Länge und der Konzentration eines einzufügenden RNA-Fragments alternative Wege für die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts hin zu den Ligations- bzw. Reparaturprodukten eröffnen (wie später bestätigt werden konnte).

4.4 Untersuchung von Hairpinribozymvarianten

4.4.1 Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne

Um in einem Twinribozym eine hohe Spezifität der Einzelribozyme für die zugehörige Substratsequenz zu gewährleisten und die Spalt- und Ligationseigenschaften der beiden Einzelmotive qualitativ und quantitativ unterscheiden zu können, sollte ein Hairpinribozym konstruiert werden, bei dem sich die Substratbindungssequenz soweit von der des Wildtyps unterscheidet, dass beide jeweils nur ihr eigenes Substrat erkennen. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, sind die Sequenzen in Helix 1 und Helix 2, über die das Substrat ans Ribozym gebunden ist, fast vollständig variabel (s. Consensussequenz in Abb. 5a, S. 10). Spiegelt man nun alle Basenpaare der Wildtyp-Substratbindungsdomäne, die entsprechend der Consensus-Sequenz ohne Aktivitätsverlust verändert werden können, so erhält man die mit SV1 bezeichnete Variante eines Hairpinribozyms (Abb. 32). Entgegen den Erwartungen zeigte dieser Typ unter Michaelis-Menten-Bedingungen aber eine deutlich geringere Spaltaktivität ($k_{\text{cat}} = 0.05 \text{ min}^{-1}$) als das Wildtypribozym ($k_{\text{cat}} = 0.2 \text{ min}^{-1}$). Die Variante SV3 mit weniger Veränderungen konnte zwar erfolgreich in einem reverskonfiguriertem Hairpinribozym eingesetzt werden, wurde aber nicht für wildtypkonfigurierte Ribozyme getestet (beide Sequenzen aus SCHMIDT 2000). Deshalb sollte zunächst auf die Ribozymsequenz SV4 zurückgegriffen werden, die mit einer ungewöhnlich hohen *single turnover* Spaltrate von $k_{\text{cat}} = 1.6 \text{ min}^{-1}$ publiziert worden war (OJWANG *et al.* 1992).

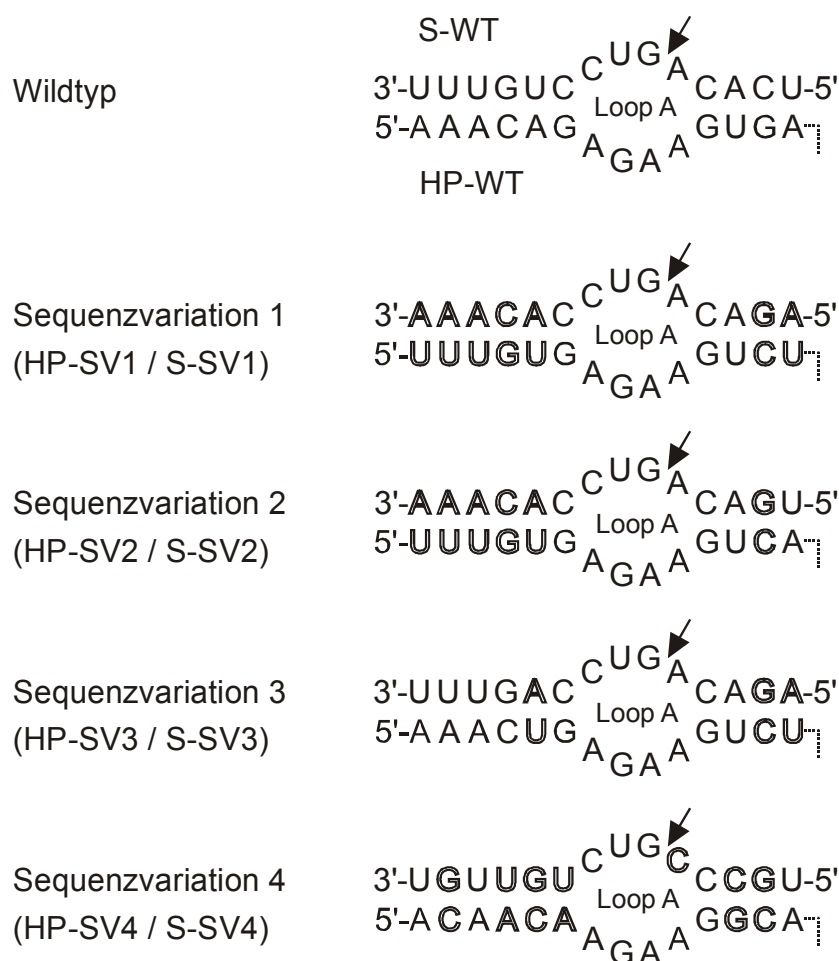


Abb. 32: Strukturen untersuchter Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne, hervorgehoben sind Unterschiede zur Wildtypsequenz.

In Spalttests mit dem Ribozym HP-SV4, dessen B-Domäne mit der des Wildtyps identisch ist (s. Abb. 4, S.9 und Tab. 12, S. 103 für die Ribozym- bzw. Tab. 10, S. 98 für die Substratsequenz), war unter *multiple turnover* Bedingungen (10 nM Ribozym + 200 nM Substrat S-SV4-3' Φ , Standardbedingungen) praktisch keine Spaltung zu beobachten, und unter *single turnover* Bedingungen (200 nM HP-SV4 + 20 nM S-SV4-3' Φ , Standardbedingungen, s. 7.2.6, Reaktion IV) wurde nur eine Spaltrate von $k_{\text{obs}} = 0.41 \text{ min}^{-1}$ erhalten, weit kleiner also, als laut Literatur zu erwarten war.

Offenbar ist es nicht trivial, effektiv schneidende Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne zu generieren. Deshalb wurde nicht mit den Sequenzen SV3 oder SV4 weitergearbeitet, sondern eingehender nach Erklärungen für das schlechte Spaltverhalten der (bereits früher in unserer Gruppe verwendeten) SV1-Ribozye gesucht.

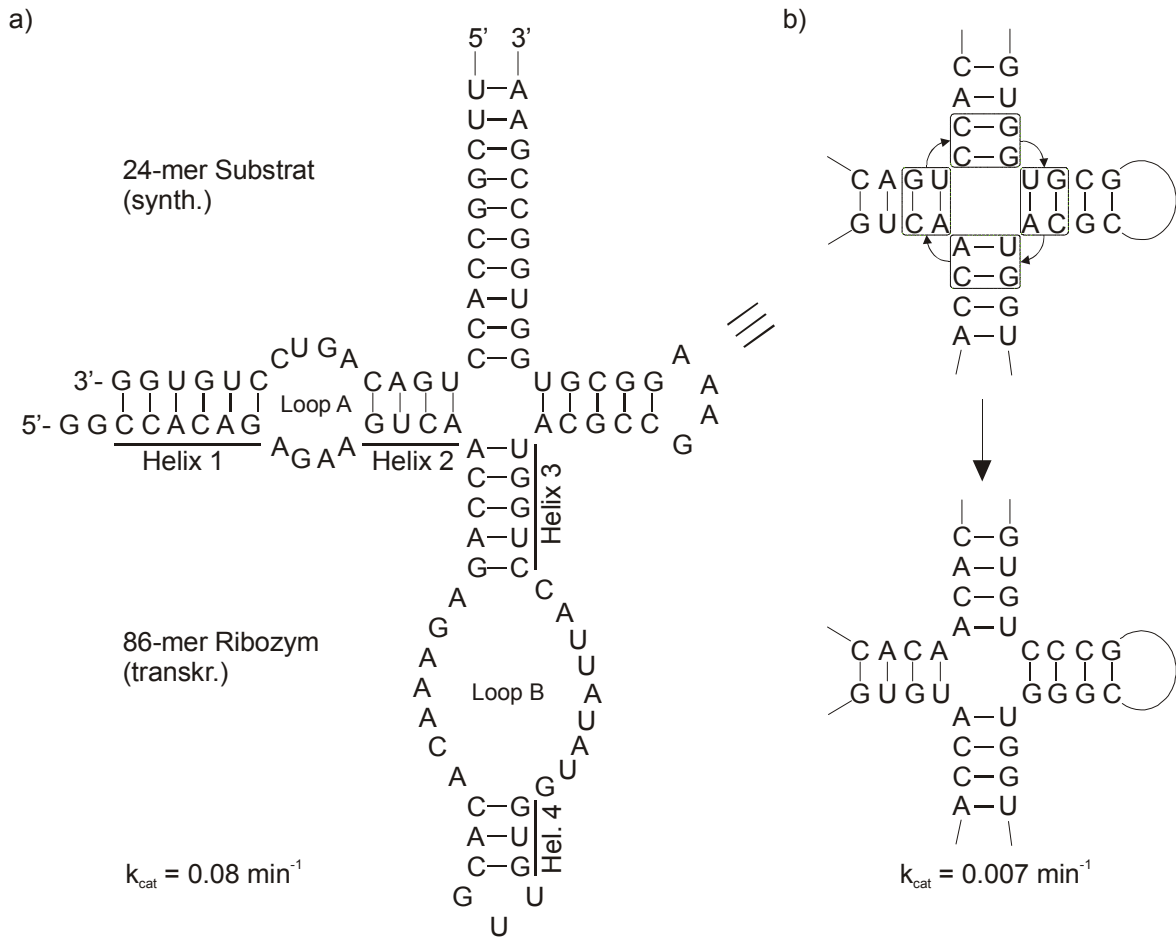


Abb. 33: Vergleich der Strukturen und Spaltraten zweier *four-way junction* Hairpinribozyme. a) Aus der Sequenz der *Tobacco Ringspot Virus* Satelliten-RNA abgeleitetes Ribozym, b) gleiches Ribozym, aber mit um 90° gedrehtem Zentralbereich der Kreuzung der 4 Helices (aus MURCHIE *et al.* 1998).

Bei der Untersuchung von Hairpinribozymen mit *four-way junction* stellten Lilley und Mitarbeiter fest (MURCHIE *et al.* 1998), dass bei Drehung der zwei zentralen Basenpaare jedes Helix-Arms an der Kreuzung um 90° ein Ribozym entsteht, dessen Spaltrate verglichen mit der des ursprünglichen Ribozyms auf ein Zehntel vermindert ist ($k_{\text{cat}} = 0.007 \text{ min}^{-1}$ gegenüber 0.08 min^{-1} , s. Abb. 33a und b). Gel-Mobilitäts-Analysen unter nativen Bedingungen ergaben, dass im ursprünglichen Ribozym die A- und B-Domänen des Hairpinribozyms jeweils mit einer der beiden anderen Helices ein koaxiales *stacking* eingehen, so dass die Ausbildung der Aktivkonformation durch Abknicken weiterhin möglich ist. Dagegen bilden die beiden Domänen im modifizierten Ribozym miteinander ein *stacking* aus, wodurch das Ribozym in die inaktive, gestreckte Konformation gezwungen wird (s. Abb. 24d, S. 40). Vergleicht man die Sequenzen der A- und B-

Domänen beider Ribozyme, so stellt man fest, dass lediglich in Helix 2 eine Verdrehung der beiden Basenpaare an der Kreuzung stattgefunden hat, genau wie es bei HP-SV1 der Fall ist. Zwar kann man das Faltungsverhalten der 4- und der 2-armigen Hairpinribozyme nicht direkt vergleichen, trotzdem sollte geprüft werden, ob eine Angleichung der beiden betreffenden Basenpaare in Helix 2 der Sequenzveränderung 1 (Abb. 32) an die Sequenz aus Abb. 33a) eine verbesserte Spaltaktivität liefert. Dazu musste nur das A-U-Basenpaar vertauscht werden, die entstehende Sequenz wurde mit SV2 bezeichnet (Abb. 34a). Vergleichende Spaltversuche mit den transkribierten Ribozymen HP-SV1 und HP-SV2 (jeweils 10 nM) und den zugehörigen, chemisch synthetisierten Substraten S-SV1-5' Φ und S-SV2-5' Φ (jeweils 200 nM) zeigten, dass unter Standardbedingungen die Spaltrate des SV2-Systems etwa 3.3fach höher liegt, als die der ursprünglichen Sequenz SV1 (s. Abb. 34b).

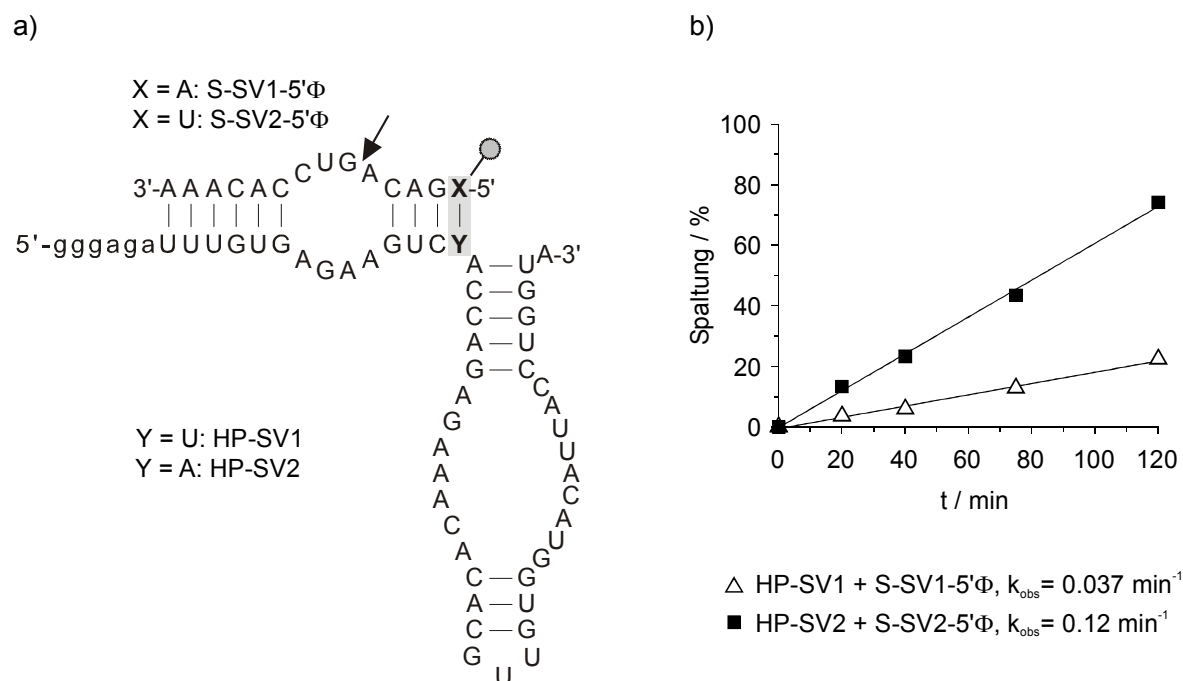


Abb. 34: a) Sekundärstruktur der Ribozym-Substrat-Komplexe zweier Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne, b) Zeitabhängigkeit der Spaltung durch diese Ribozyme und Vergleich der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten.

Wenn die Umkehr eines einzelnen Basenpaars am Ende der Helix 2 eine derartige Aktivitätssteigerung bewirkt, dann ist offenbar die Fähigkeit der Hairpinribozyme, über das Abknicken zwischen Helix 2 und 3 in die Aktivkonformation zu falten, stark von der Basenabfolge am Knickpunkt abhängig. Mit der Sequenz SV2 wurde ein Ribozym erhalten, dessen Spaltrate im gleichen Bereich wie die des Wildtyps ($k_{\text{cat}} = 0.2 \text{ min}^{-1}$) liegt, und das somit als zweites Motiv für ein Twinribozym eingesetzt werden kann. Die kinetischen Parameter für diese Sequenz unter Michaelis-Menten- und unter *single turnover* Bedingungen wurden mit optimierten (s. Kap. 4.4.2.3) und zur 3WJ erweiterten Ribozymen (Kap. 5.3.1) bestimmt.

4.4.2 Verbesserung der Akzeptanz von Spermin als Kofaktor

4.4.2.1 Polyamine als Kofaktoren für Hairpinribozyme

Das Hairpinribozym ist in wässrigen Reaktionslösungen nur in Anwesenheit kationischer Kofaktoren aktiv, insbesondere zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+} etc.) eignen sich dafür (s. Kap. 1.2). Vor wenigen Jahren konnte die Gruppe um Gait zeigen, dass die dreisträngige Minimalform des Wildtyps (Abb. 5b, S. 10) bei Zusatz von Aminoglycosid-Antibiotika oder von Spermin selbst in Abwesenheit von Metallkationen Spaltaktivität im Bereich der mit Mg^{2+} katalysierten Reaktion aufweist (EARNSHAW *et al.* 1998). Außerdem wurde gefunden, dass Spermin- MgCl_2 -Mischungen eine synergistische Wirkung zeigen und bis zu 3fach höhere Spaltraten erzeugen, als einzeln zugesetzt. Zur selben Zeit wurde in unserer Arbeitsgruppe die gleiche, positive Wirkung von Spermin auf die Spaltaktivität unterschiedlicher Hairpinribozyme festgestellt und für die Optimierung eines Twinribozyms aus einem Wildtyp und einem reversen Hairpinribozym eingesetzt (SCHMIDT *et al.* 2000, s. Abb. 39, S. 68). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Wirkung des Spermins auf den zweisträngigen Wildtyp getestet, der in dieser Arbeit als Basis für die Generierung der 3WJ-Ribozyme diente. Dabei musste festgestellt werden, dass bei Verwendung von Spermin in Reaktionen von HP-WTL eine inhibierende Wirkung eintrat, und dass MgCl_2 -Spermin-Mischungen keine synergistischen Effekte lieferten (Abb. 35). Dies stimmt mit der schon früher gemachten Beobachtung überein, dass das Polyamin Spermidin die Spaltreaktion des zweisträngigen Wildtyps (HP-WTL) bei Konzentrationen $> 1 \text{ mM}$ inhibiert (CHOWRIRA *et al.* 1993).

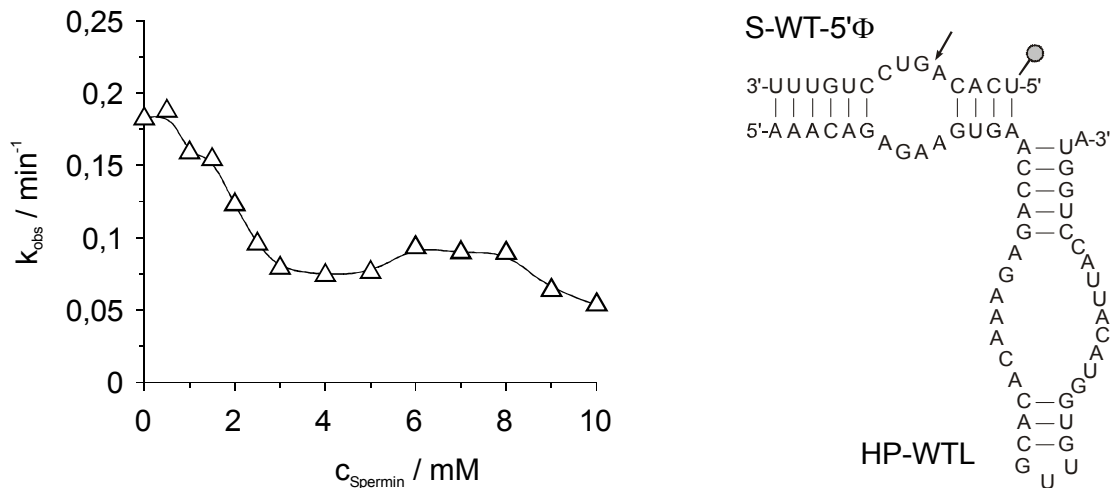


Abb. 35: Inhibierung der Spaltreaktion von HP-WTL durch Spermin bei konstanter MgCl_2 -Konzentration (10 mM) unter Standardbedingungen.

Was war der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten der sehr ähnlichen Hairpinribozyme? HP-WT und HP-WTL (s. Abb. 36) differieren in verschiedenen strukturellen Eigenschaften:

1. Der dreisträngige Wildtyp HP-WT wurde (sowohl in unserer Gruppe als auch in der Earnshaw-Publikation, s. oben) chemisch synthetisiert, trägt also am 5'-Ribozymende (Helix 1) keine überhängenden Nukleotide der Transkriptions-optimierungssequenz;
2. Helix 4 enthält 6 bp bei HP-WT, aber nur 3 bp bei HP-WTL;
3. dafür ist Helix 4 bei HP-WTL durch einen Loop aus 3 Basen stabilisiert.

Durch Modifizierung dieser Merkmale sollte im folgenden die Sperminakzeptanz des HP-WTL-Ribozyms erhöht werden, denn zum einen ist Spermin das am häufigsten vorkommende Polyamin in eukaryotischen Zellen (WALLACE 1989, PEGG *et al.* 1989) und spielt damit eine in Betracht zu ziehende Rolle bei möglichen *in vivo* Anwendungen (EARNSHAW 1998). Zum anderen bietet der Einsatz verschiedener Spermin- MgCl_2 -Mischungen die Möglichkeit, auf die Aktivität der Einzelmotive eines Twinribozyms Einfluss zu nehmen.

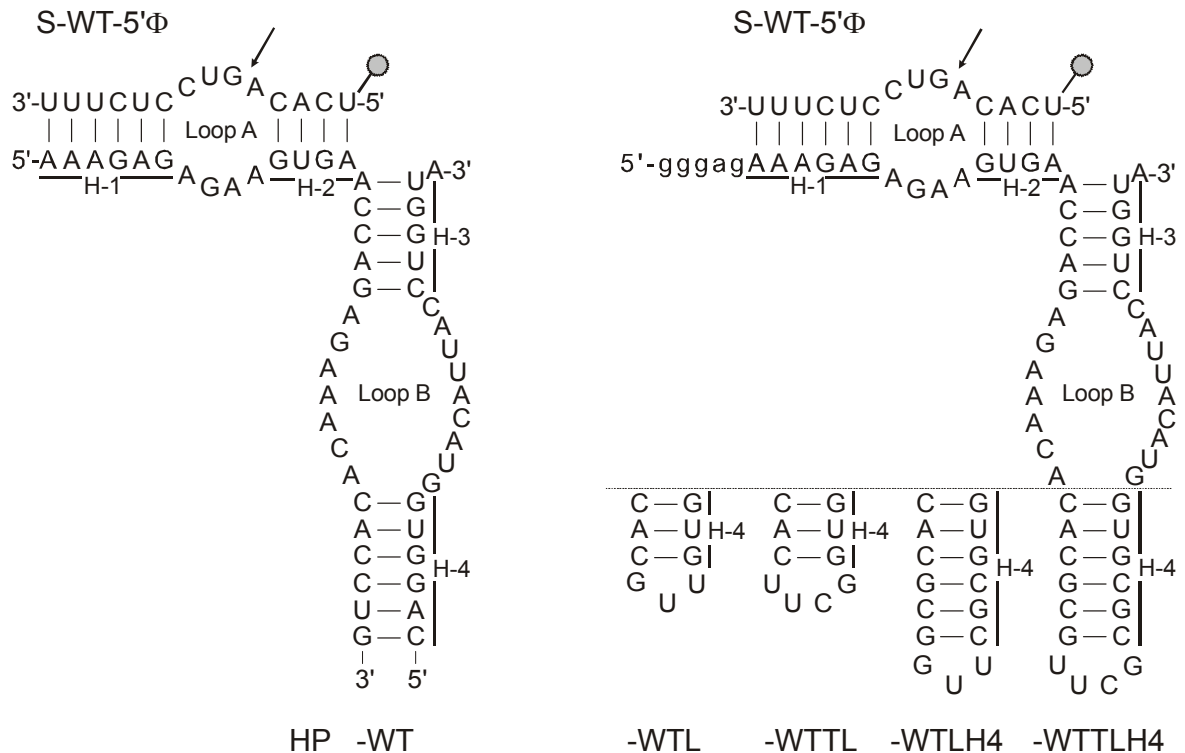


Abb. 36: Sekundärstrukturen untersuchter Hairpinribozyme, die das Wildtypsubstrat S-WT-5'Φ spalten (Pfeil). Die transkribierten Ribozyme HP-WTL, HP-WTTL, HP-WTLH4 und HP-WTTLH4 (zusätzliche Transkriptionsoptimierungssequenz in kleinen Buchstaben) unterscheiden sich nur in Helix 4.

4.4.2.2 Ergebnisse der systematischen Veränderung von HP-WTL in Helix 4

Aufgrund der Ergebnisse des letzten Kapitels sollten auf der Struktur von HP-WTL basierende Hairpinribozyme synthetisiert werden, deren Standard-GUU-Loop gegen einen für seine strukturstabilisierende Wirkung bekannten Tetraloop (SCHMIDT 2000) ausgetauscht ist, bzw. deren Helix 4 von 3 auf 6 Basenpaare verlängert ist. Dementsprechend wurden die Ribozyme HP-WTTL, HP-WTLH4 und HP-WTTLH4 auf enzymatischem Wege hergestellt (s. Abb. 36). Um den Einfluss von Spermin auf die Spaltaktivität dieser Ribozyme im Vergleich zu HP-WT und HP-WTL zu untersuchen, wurden je Ribozym drei verschiedene Reaktionen mit variierender Kofaktorkonzentration durchgeführt: Bei 37 °C wurden 10 nM Ribozym und 200 nM S-WT-5'Φ in 10 mM Tris·HCl pH 7.5 mit a) 10 mM MgCl₂, b) 12 mM Spermin oder c) 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin versetzt (die von den Standardbedingungen abweichenden Tris- und die

Wahl der Kofaktorkonzentrationen hingen mit der angestrebten Vergleichbarkeit mit reversen Hairpinribozymen zusammen, WELZ *et al.* 2001). Die daraus resultierenden Zeitkurven des Substratumsatzes sind in Abb. 37 gezeigt, die ermittelten k_{obs} -Werte für die Reaktionsgeschwindigkeiten in Tab. 6 aufgelistet.

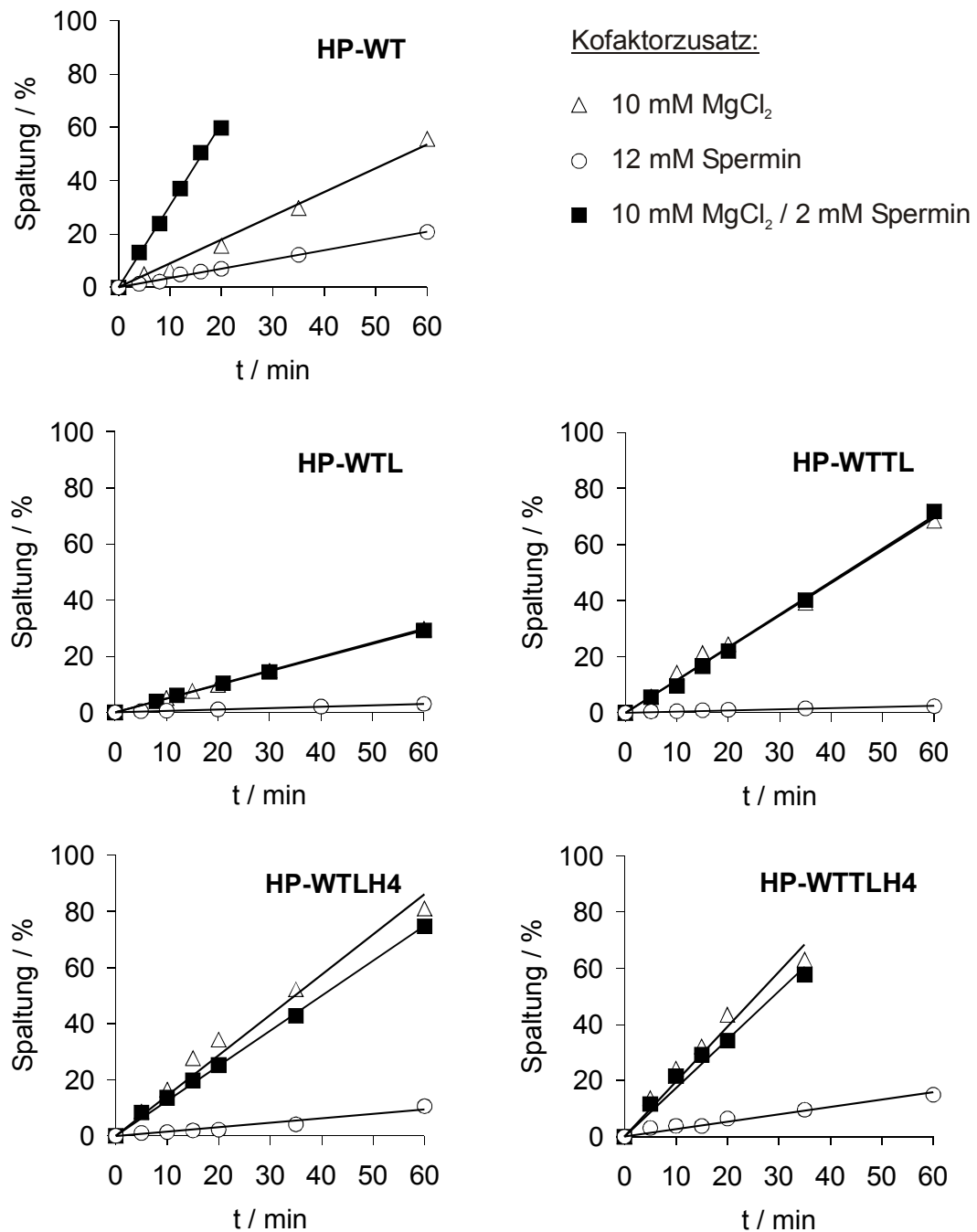


Abb. 37: Spaltkurven für unterschiedliche Hairpinribozyme bei variierender Kofaktorkonzentration (Substrat S-WT-5' Φ , 10 mM Tris·HCl pH 7.5, 37 °C).

Tab. 6: Ermittelte Reaktionsgeschwindigkeiten der Spaltung von S-WT-5'Φ durch verschiedene Hairpinribozyme bei verschiedenen Kofaktorkonzentrationen.

| Ribozym | $k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$ bei 10 mM MgCl_2 | $k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$ bei 12 mM Spermin | $k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$ bei 10 mM MgCl_2 / 2 mM Spermin |
|-----------|---|---|---|
| HP-WT | 0.21 | 0.06 | 0.47 |
| HP-WTL | 0.19 | 0.01 | 0.19 |
| HP-WTTL | 0.23 | 0.01 | 0.24 |
| HP-WTLH4 | 0.27 | 0.06 | 0.25 |
| HP-WTTLH4 | 0.42 | 0.05 | 0.39 |

Das dreisträngige Ribozym HP-WT zeigt wie beschrieben gegenüber der nur Mg^{2+} -unterstützten Reaktion eine doppelt hohe Schnittrate bei Zugabe einer geringen Konzentration an Spermin (Verhältnis 10:2), und Sperminzusatz allein bewirkt immer noch eine Spaltrate von 0.06 min^{-1} , also ca. 1/3 der Geschwindigkeit der MgCl_2 -Reaktion. Demgegenüber ergibt die Mg^{2+} -Spermin-Mischung für HP-WTL keinen synergistischen Effekt, und setzt man nur Spermin zu, so vermindert sich die Spaltrate auf etwa 1/20 des Wertes der MgCl_2 -Reaktion. Die Einführung des Tetraloops bei HP-WTTL bewirkt keine deutliche Änderung der Spalteigenschaften verglichen mit HP-WTL. Die Verlängerung der Helix 4 um 3 bp aber hebt die k_{obs} -Werte der Ribozyme HP-WTLH4 und HP-WTTLH4 bei Sperminzusatz deutlich auf 0.06 bzw. 0.05 min^{-1} , also ungefähr auf den Wert von HP-WT. Und auch die Geschwindigkeiten der MgCl_2 -unterstützten Reaktion sind bei beiden Ribozymen erhöht, die besten Werte liefert HP-WTTLH4 mit $k_{\text{obs}} = 0.42 \text{ min}^{-1}$. Auch wenn hier wiederum keine weitere Steigerung durch Zusatz beider Kofaktoren eintritt, so liegt die Spaltrate bereits im Bereich der Spaltrate von HP-WT unter Verwendung der Mg^{2+} -Spermin-Mischung ($k_{\text{obs}} = 0.47 \text{ min}^{-1}$). Wie lassen sich diese Daten interpretieren?

Spermin ist in der Lage, die A-Form von RNA, also doppelsträngige Helixbereiche, zu stabilisieren (ROBINSON und WANG 1996). Damit kann es durch Wechselwirkung mit Helix 4 die Struktur der B-Domäne des dreisträngigen HP-WT stabilisieren; der Effekt sollte bei den anderen untersuchten Ribozymen deutlich geringer ausfallen, da dort der Abschluss der Helix durch einen Loop für Stabilisierung sorgt – eine Erklärung für die Tatsache, dass nur bei HP-WT eine synergistische Wirkung der Kofaktormischungen

auftritt. Außerdem kann Spermin die Spaltreaktion einerseits hemmen, indem es die inaktive, gestreckte Form der zweiarmligen Hairpinribozyme stabilisiert, die ein koaxiales *stacking* zweier Helices beinhaltet (s. Abb. 24d, S. 40), andererseits begünstigen, indem es als Polykation die Coulomb-Abstoßung der Domänen bei der Zusammenlagerung in die Aktivkonformation vermindert. Die negative Wirkung wäre für alle verwendeten Ribozyme gleich, dagegen könnte eine Begünstigung davon abhängen, wie gut Spermin mit Helix 4 wechselwirken kann. Möglicherweise bietet die auf 6 bp verlängerte Helix in HP-WTLH4 und HP-WTTLH4 eine bessere Struktur für die Bindung von Spermin, resultierend in besseren Spaltraten dieser Ribozyme bei 12 mM Spermin im Vergleich zu HP-WTL und HP-WTTL. Die Verlängerung der Helix 4 bewirkt aber auch eine erhöhte Schnittrate für die $MgCl_2$ -unterstützte Reaktion, so dass geschlussfolgert werden kann, dass dadurch das Domänenendocking generell begünstigt wird. Ferner kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass Spermin nicht in der Lage ist, die Spaltreaktion in gleicher Weise zu katalysieren, wie Magnesiumionen. Die Annahme, Spermin könnte aufgrund seiner Größe nicht an den gleichen Stellen mit dem Ribozym in Kontakt treten wie Metallkationen, wird durch die negativen Ergebnisse widerlegt, die mit anderen Polyaminen, unter anderem Ethylendiamin und 1,3-Diaminopropan (den strukturellen Grundbausteinen des Spermins und des Spermidins), gemacht wurden (SCHMIDT 2000). Die Anordnung der Amino- bzw. Ammoniumgruppen im Spermin ist offenbar Voraussetzung für die aktivierende Wechselwirkung mit dem Ribozym, auch wenn bisher nicht geklärt ist, ob es sich um eine sequenz- bzw. strukturspezifische Wechselwirkung oder um eine unspezifische Helixkomplexierung handelt. In unserer Arbeitsgruppe wird dieser Frage in anderen Projekten durch die Synthese cyclischer und funktionalisierter Sperminanaloga nachgegangen (z.B. DOMBOS 2003).

4.4.2.3 Übertragung der optimierten Struktur auf die Sequenz SV2

Wenn sich die Erweiterungen, die zu HP-WTTLH4 führten, günstig auf die Aktivität der Ribozyme mit Wildtyp-Substratsequenz auswirken, sollten sie auch auf die Sequenz SV2 anwendbar sein. Deshalb wurde auf enzymatischem Weg das Ribozym HP-SV1TLH4 (in Analogie zu HP-WTTLH4, s. Abb. 38) synthetisiert, und für beide Ribozyme wurden die Michaelis-Menten-Parameter mit den zugehörigem Substrat bestimmt (s. Tab. 7).

Tab. 7: Kinetische Parameter der optimierten Ribozyme für die Spaltung unter Michaelis-Menten-Bedingungen.

| | k_{cat} (min^{-1}) | K_M (nM) | k_{cat}/K_M ($10^{-3}\text{min}^{-1}\text{nM}^{-1}$) |
|------------------------------|--|--------------|---|
| HP-WTTLH4 / S-WT-5' Φ | 0.49 ± 0.09 | 66 ± 20 | 7.4 |
| HP-SV2TLH4 / S-SV2-5' Φ | 0.52 ± 0.03 | 433 ± 81 | 1.2 |

Wie man erkennt, spalten beide Ribozyme mit gleicher Geschwindigkeit, nur die K_M -Werte unterscheiden sich. HP-SV2TLH4 zeigt einen größeren K_M -Wert und dadurch auch einen kleineren Wert für die katalytische Effektivität k_{cat}/K_M (die Bedeutung von K_M und k_{cat} wurde in Kapitel 3.2 beschrieben).

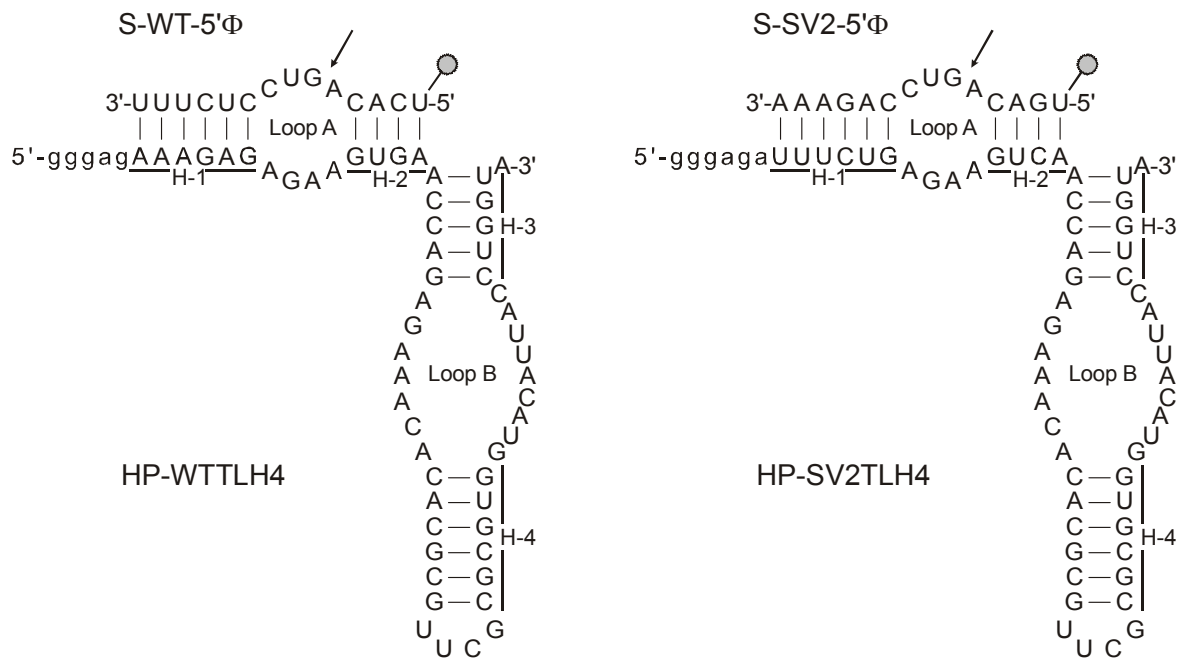


Abb. 38: Die beiden optimierten Hairpinribozyme HP-WTTLH4 und HP-SV2TLH4, die unterschiedliche Substratsequenzen spalten.

Der K_M -Wert ist in jedem Fall auch von der Länge der substratbindenden Helices 1 und 2 abhängig, die sich schon beim Übertragen der Sequenzen auf *three-way junction* Ribozyme ändern. Da in einem Twinribozym möglichst zwei Einzelmotive mit gleicher Aktivität

eingesetzt werden sollten, denn das Reparaturkonzept sieht das gleichzeitige Spalten und Ligieren an beiden Aktionsorten vor, war mit diesen beiden Hairpinribozymen ein idealer Ausgangspunkt für die Synthese eines Twinribozym erreicht.

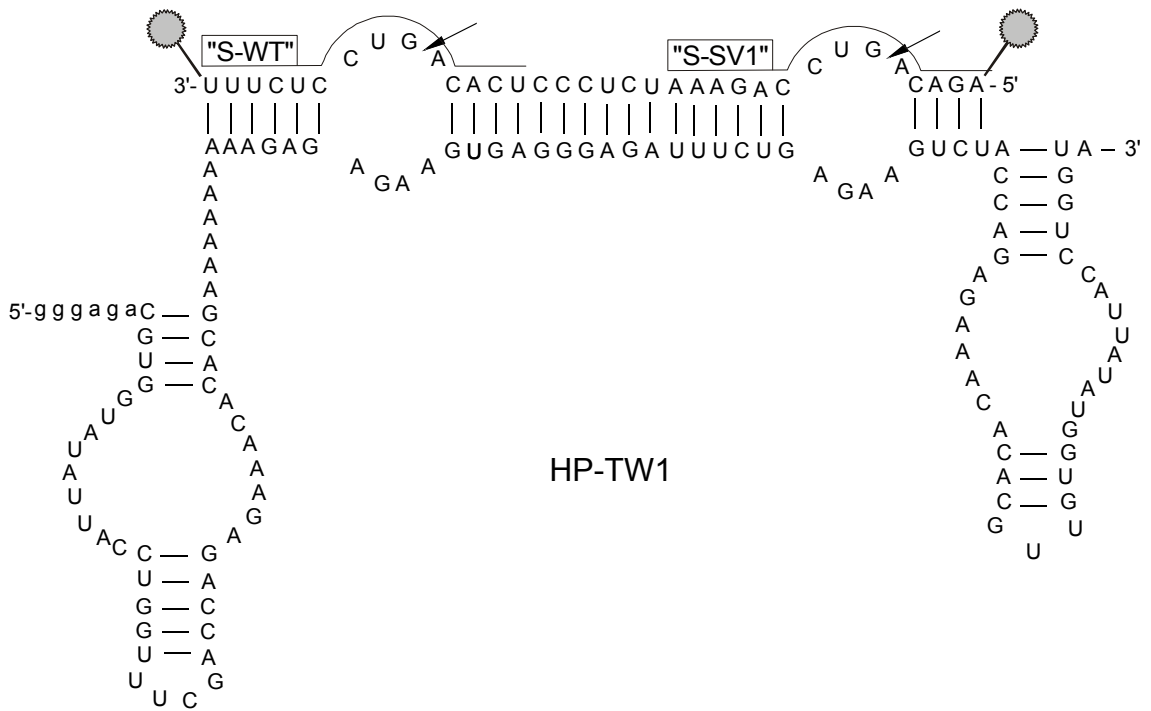
5 Synthese doppelerspaltender Twinribozyme

5.1 Enzymatische Synthese – Erster Versuch

Unsere ersten Twinribozyme waren aus einem revers- und einem wildtypkonfiguriertem Hairpinribozym zusammengesetzt (Abb. 39a). HP-TW1 zeigte Doppelschnittaktivität, dabei spaltete der reverse Ribozymteil die Wildtyp-Substratsequenz (= S-WT), während das wildtyp-konfigurierte Motiv die veränderte Sequenz SV1 schnitt (SCHMIDT *et al.* 2000). Es wurde aufgrund der großen Länge (114 Nukleotide) nicht chemisch, sondern enzymatisch hergestellt. In gleicher Weise sollte nun ein Twinribozym aus zwei wildtypkonfigurierten Hairpinribozymen, genauer einem HP-TJ₃ und einem HP-WTL, generiert werden, um es auf Doppelschnittaktivität zu testen und damit die Funktionalität der Tandemkonfiguration zu bestätigen. Der für die Transkription benötigte DNA-Doppelstrang sollte standardmäßig durch Doppelstrangauffüllreaktion aus zwei teilweise überlappenden, einzelsträngigen DNA-Primern erzeugt werden (s. 2.2.1). Die chemische Synthese und die Aufreinigung (PAGE) von P1-TW2-T7 und P2-TW2 (79 und 72 nt, s. Tab. 11, S. 102) verliefen ohne Probleme, alle Versuche zur enzymatischen Doppelstrangsynthese hingegen blieben erfolglos. Es wurden zwar teilweise Produkte erhalten, die geringere gelelektrophoretische Mobilität aufwiesen als die Primer, deren Transkription nach erfolgter Isolierung aber inaktive Ribozyme lieferte. Detaillierte Sequenzanalyse hinsichtlich Komplementarität lieferte eine Erklärung für dieses Problem: Neben der angestrebten Überlappung von 20 Nukleotiden am jeweiligen 3'-Ende der DNA-Einzelstränge (Abb. 40a) konnten die Primer einen viel stabileren Komplex aus 43 (36 + 7) komplementären Basenpaaren bilden (Abb. 40b). Selbst wenn die zugesetzte DNA-Polymerase die Primer in einem solchen Komplex verlängern würde, erhielte man im Ergebnis stark verkürzte und teilweise ungepaarte DNA-Doppelstränge, deren Transkription scheitern muss. Es war nahe liegend, dass der unerwünschte Duplex durch strukturelle Gegebenheiten bedingt war.

a)

S-TW1-3'Φ5'Φ



b)

S-TW2 = S-TJ

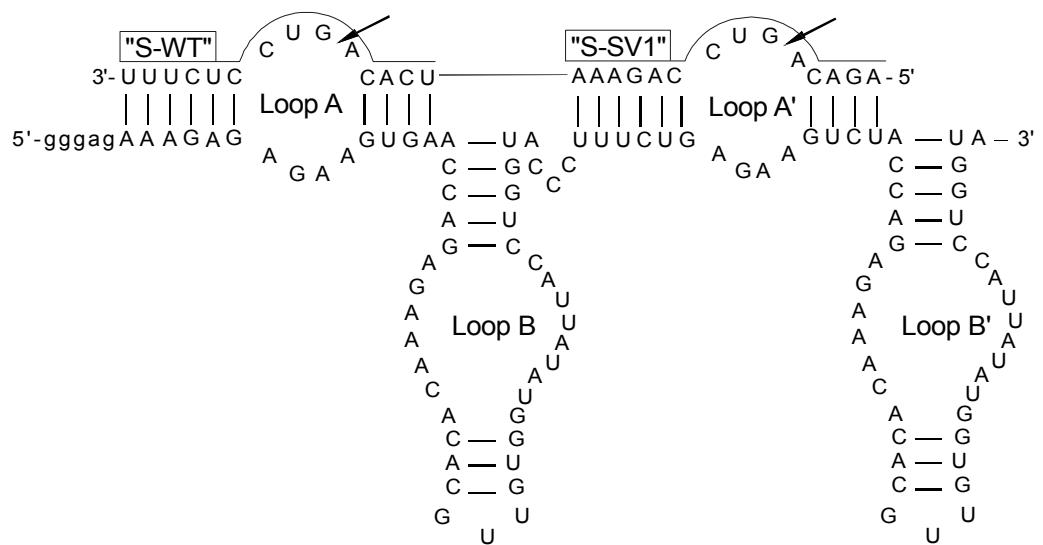


Abb. 39: Sekundärstrukturen der Twinribozyme a) HP-TW1, das aus einem reversen und einem Wildtyp-Hairpinribozym zusammengesetzt ist und b) HP-TW2, einem tandemkonfigurierten Twinribozym aus zwei wildtypkonfigurierten Hairpinribozymen. In den Substraten sind die Sequenzen der Einzelmotive hervorgehoben (s. auch Abb. 38 und Abb. 32).

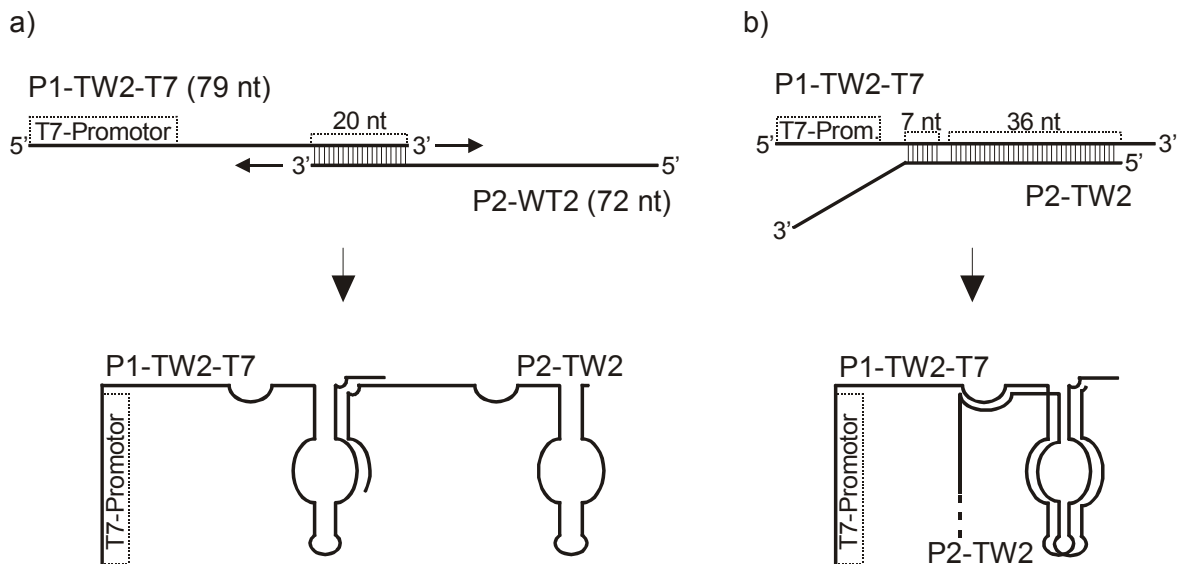


Abb. 40: Schematische Illustration der komplementären Bereiche der Primer und deren Lage in der Struktur des angestrebten Twinribozyms HP-TW2; a) gewünschter und b) unerwünschter Duplex.

Bedingt durch die Strategie, zwei möglichst gleich lange Primer zu verwenden (dies ermöglicht optimale Ausbeuten bei der chemischen DNA-Synthese), die sich in der Mitte überlappen und damit praktisch als ein Positiv- und ein Negativstrang betrachtet werden können, ergibt sich für tandemkonfigurierte Twinribozyme ein spezifisches Problem, das bei denen des Typs HP-TW1 nicht auftritt: Hier sind zwei identische B-Domänen der Einzelmotive (Sequenzlänge 36 nt) einmal im positiven und einmal im negativen Strang, also voll komplementär (Abb. 40b unten). Dem ließe sich durch Sequenzveränderungen in der B-Domäne eines der Motive entgegenwirken, die zu einer Destabilisierung dieses unerwünschten Duplexes führen würde - eine Möglichkeit, die später auch zum Erfolg führte. Zunächst sollte jedoch ein anderer Weg beschritten werden.

5.2 Chemische Synthese eines Twinribozyms

5.2.1 Synthese und Reinigung einer 141-mer RNA

Unsere guten Ergebnisse mit BMT als Aktivator bei der chemischen RNA-Synthese und die im letzten Abschnitt genannten Probleme bei der enzymatischen Synthese tandem-

konfigurierter Twinribozyme motivierten uns zu dem Versuch, ein solches Ribozym vollständig durch Festphasensynthese herzustellen. Den Ergebnissen aus Kapitel 4 folgend wurde ein neues Twinribozym HP-TW3 entworfen, das aus HP-TJ₃-V (einer geringfügig veränderten Variante von HP-TJ₃) und HP-TJ₃-SV2 zusammengesetzt war (Erläuterung zu diesen Ribozymen und den Sequenzveränderungen s. Abschnitt 5.3.1, S. 76).

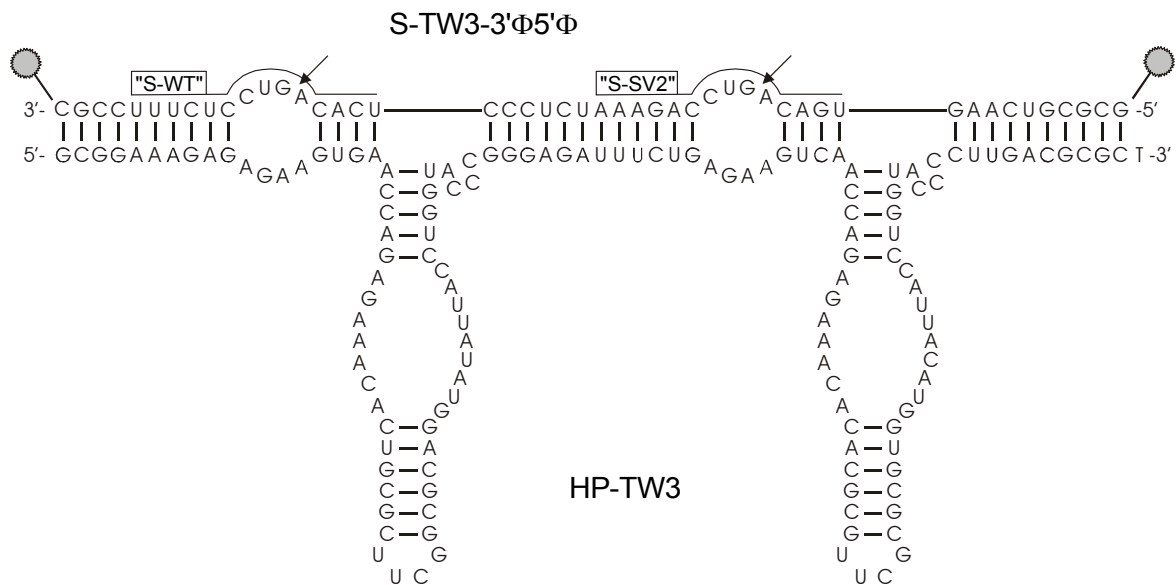


Abb. 41: Sekundärstruktur des Twinribozyms HP-TW3, dessen Spaltstellen (Pfeile) innerhalb des Substrates S-TW3-3'Φ5'Φ in Bereichen mit Wildtyp- und SV2-Sequenz liegen.

Dass die Synthese einer 141-mer RNA ein gewisses Wagnis darstellte, sei anhand folgender Zahlen verdeutlicht: Nach 140 Kupplungsreaktionen sind bei durchschnittlicher Ausbeute von 99,5 % je Schritt ca. 50 % an Zielprodukt zu erwarten, bei 99 % je Schritt ca. 25 % Produkt, und bei 98 % je Schritt senkt sich die Gesamtausbeute schon auf unter 6 %. Mit BMT als Aktivator und den Standardphosphoramiditen wurden Kupplungsausbeuten > 99 % erhalten (WELZ und MÜLLER 2002), aber ob das bei 140 Einzelreaktionen (die Capping-, Oxidations- und Entschützungs-schritte nicht mitgerechnet) erreicht werden kann, war fraglich.

Die Synthese der 141-mer RNA erfolgte an einem DNA-Träger, da die kommerziell erhältlichen RNA-Träger aufgrund der geringen Porenweite für Synthesen > 100 Basen nicht geeignet sind (daher der Thymidinrest am 3'-Ende des Ribozyms, s. Abb. 41). Das

Syntheseprotokoll der (auf Einzelreaktionen korrigierten) Kupplungsausbeuten, die über automatische photometrische Detektion der abgespaltenen Dimethoxytritylgruppe bestimmt wurden, zeigte zufrieden stellende Einzelausbeuten von durchschnittlich 99 %. Die Synthese war demzufolge erfolgreich verlaufen, große Probleme bereitete aber die folgende Aufarbeitung und Isolierung der Ziel-RNA. Die Syntheseprodukte wurden zunächst dem Standardprotokoll folgend vom Träger abgespalten und entschützt, konnten aber weder mittels HPLC noch gelelektrophoretisch in diskrete Peaks bzw. Banden aufgetrennt werden. Auch verschärfte Denaturierungsbedingungen, wie Temperaturen bis zu 80 °C, die Verwendung von Acrylamidlösungen in Formamid für die Gelzubereitung oder die Glyoxylierung der Syntheseprodukte zeigten keine Wirkung bezüglich der Auflösung in eine Bandenstruktur, ebenso wenig die Verwendung eines DNA-Substratanalogons zur Isolierung eines Ribozym-Substrat-Komplexes mittels nativer Gelelektrophorese (s. Abschnitt 7.2.4.8). Bei einem Kontrollexperiment zeigte das Produktgemisch jedoch eine geringe, aber eindeutige Spaltaktivität sowohl mit S-WT-5'Φ als auch mit S-SV2-5'Φ.

Zur Abtrennung der längsten Syntheseprodukte von den kürzeren Abbruchfragmenten wurde nun folgende Strategie eingesetzt: Eine am 3'-Ende mit Biotin markierte 15-mer DNA-„Sonde“ AS15-3'Biotin, die zum 5'-Ende von HP-TW3 komplementär ist (also zu den bei der Synthese zuletzt angefügten 15 Nukleotiden), wurde mit dem Produktgemisch der RNA-Synthese hybridisiert und anschließend auf eine mit Streptavidin beladene Agarose-Säule gegeben. Zuerst wurde mit dem Hybridisierungspuffer (native Bedingungen) gewaschen, um die nicht gebundenen RNA-Stränge zu eluieren. Die Elution der gebundenen Syntheseprodukte erfolgte dann mit denaturierendem, harnstoffhaltigem Puffer, wobei der Komplex aus RNAs und Sonde gespalten wurde, während die Sonde selbst auf der Säule verblieb. Auf diese Weise wurden 94,8 % des Rohmaterials abgetrennt und 5,2 % gereinigte RNA-Stränge erhalten (bezogen auf die optische Dichte der Gemische). Auch nach dieser Prozedur konnten auf Polyacrylamidgelen keine Banden oder Flecken beobachtet werden. HP-TW3 ist eine stark strukturierte RNA mit einer Vielzahl von denkbaren intra- und intermolekularen Wechselwirkungen. Sehr wahrscheinlich ist dies der Grund, warum eine eindeutige Auftrennung des Produktgemischs mit den verwendeten Methoden nicht möglich war. Trotzdem sollte die mittels biotinylierter Sonde isolierte Produktfraktion auf Doppelsplattungsaktivität untersucht werden.

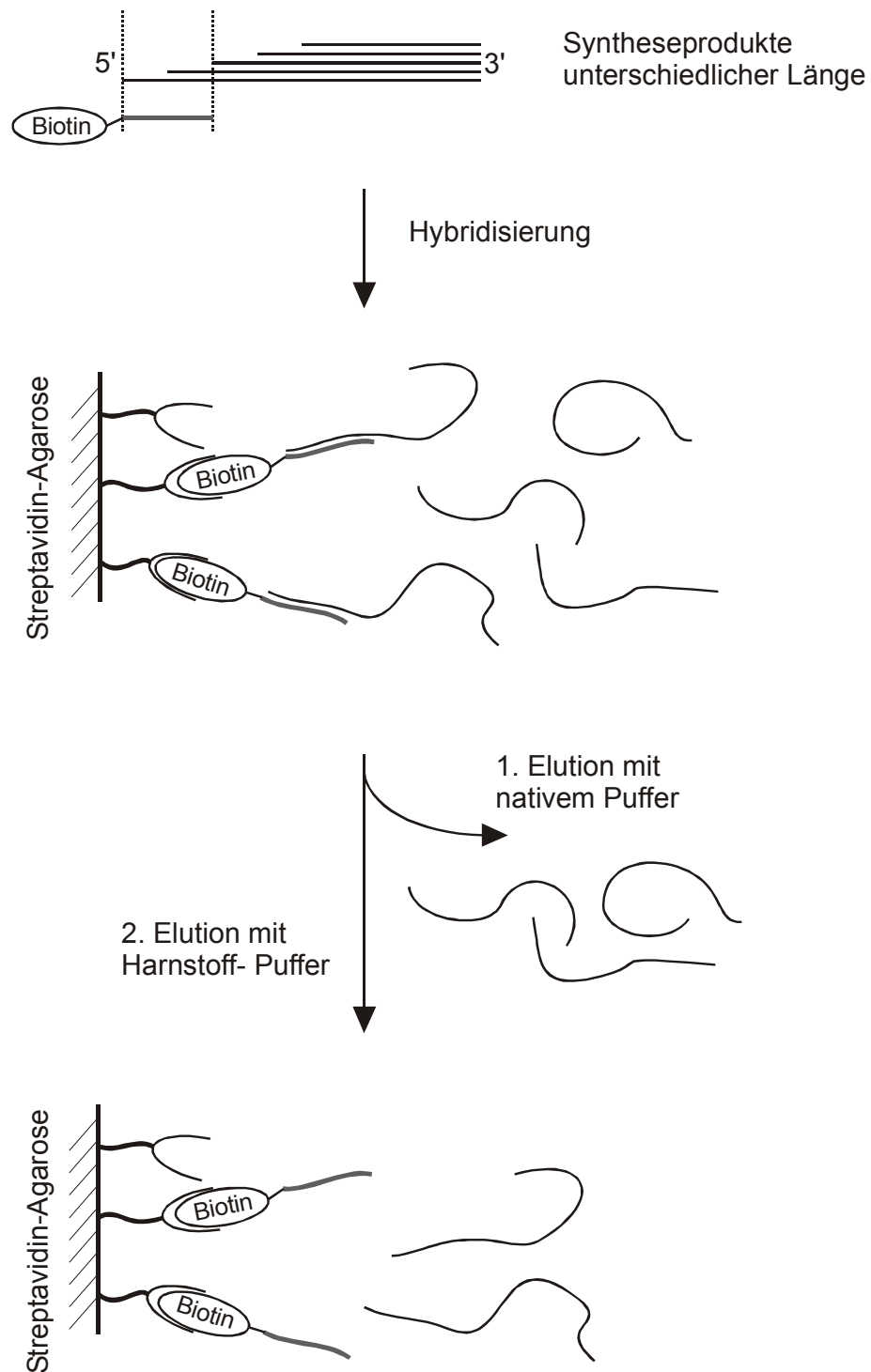


Abb. 42: Reinigung des Produktgemischs der chemischen RNA-Synthese mittels einer biotinylierten DNA-Sonde und einer mit Streptavidin beladenen Agarosesäule (Details s. Kap. 7.2.4.8, S. 107).

5.2.2 Spaltaktivität des Syntheseprodukts

Erste Spalttests mit der isolierten HP-TW3-Fraktion zeigten Aktivität an beiden Spaltstellen. Um auszuschließen, dass eines der Motive das Substrat des anderen spaltet, wurden parallel zum Twinribozym die beiden Einzelribozyme HP-TJ₃-V und HP-TJ₃-SV2 jeweils mit den beiden 14-mer Substraten S-WT-5'Φ und S-SV2-5'Φ umgesetzt (Abb. 43).

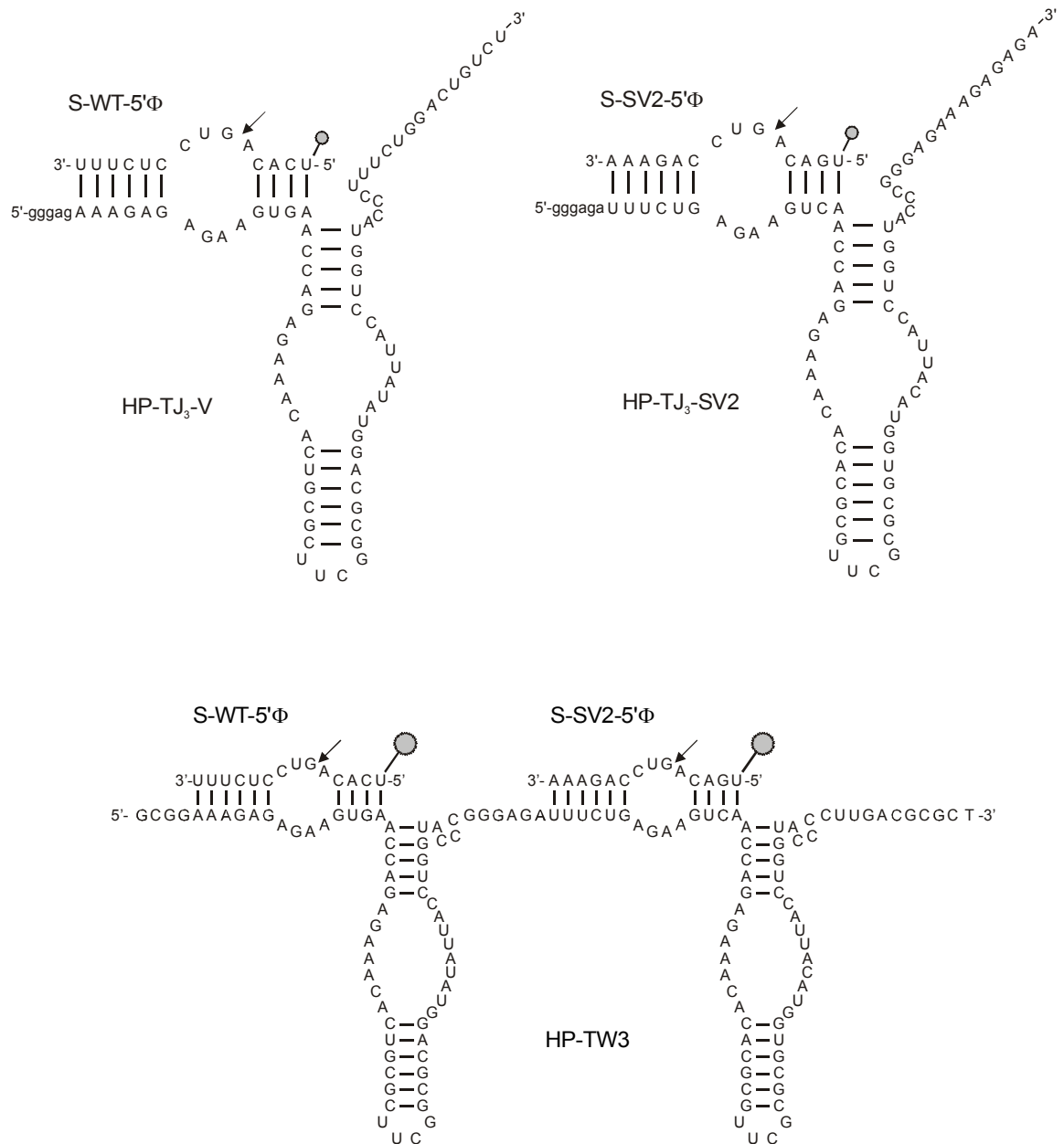


Abb. 43: Sekundärstrukturen verschiedener Ribozym-Substrat-Komplexe. Die Einzelmotive HP-TJ₃-V und HP-TJ₃-SV2 schneiden spezifisch nur die passenden Substrate S-WT-5'Φ bzw. S-SV2-5'Φ, das Twinribozym HP-TW3 zeigt bei beiden Substraten Spaltaktivität (s. dazu Abb. 43 und Abb. 45).

Die Rohdaten der Spaltreaktionen von je 100 nM Ribozym und 100 nM Substrat unter Standardbedingungen (37 °C, 10 mM MgCl₂ und 40 mM Tris·HCl pH 7.5) sind in Abb. 44 gezeigt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass HP-TJ₃-V nur das WT-Substrat schneidet (Bahnen 1 und 4), während HP-TJ₃-SV2 ausschließlich das zugehörige SV2-Substrat spaltet (Bahnen 2 und 5). HP-TW3 ist in der Lage *beide* Substrate zu spalten (Bahnen 3 und 6). Zusammen mit der erwarteten hohen Spezifität der Einzelribozyme bezüglich ihrer Substrate lässt dies nur eine Schlussfolgerung zu: HP-TW3 muss beide Einzelmotive vollständig enthalten, die Synthese der 141-mer RNA war also geglückt.

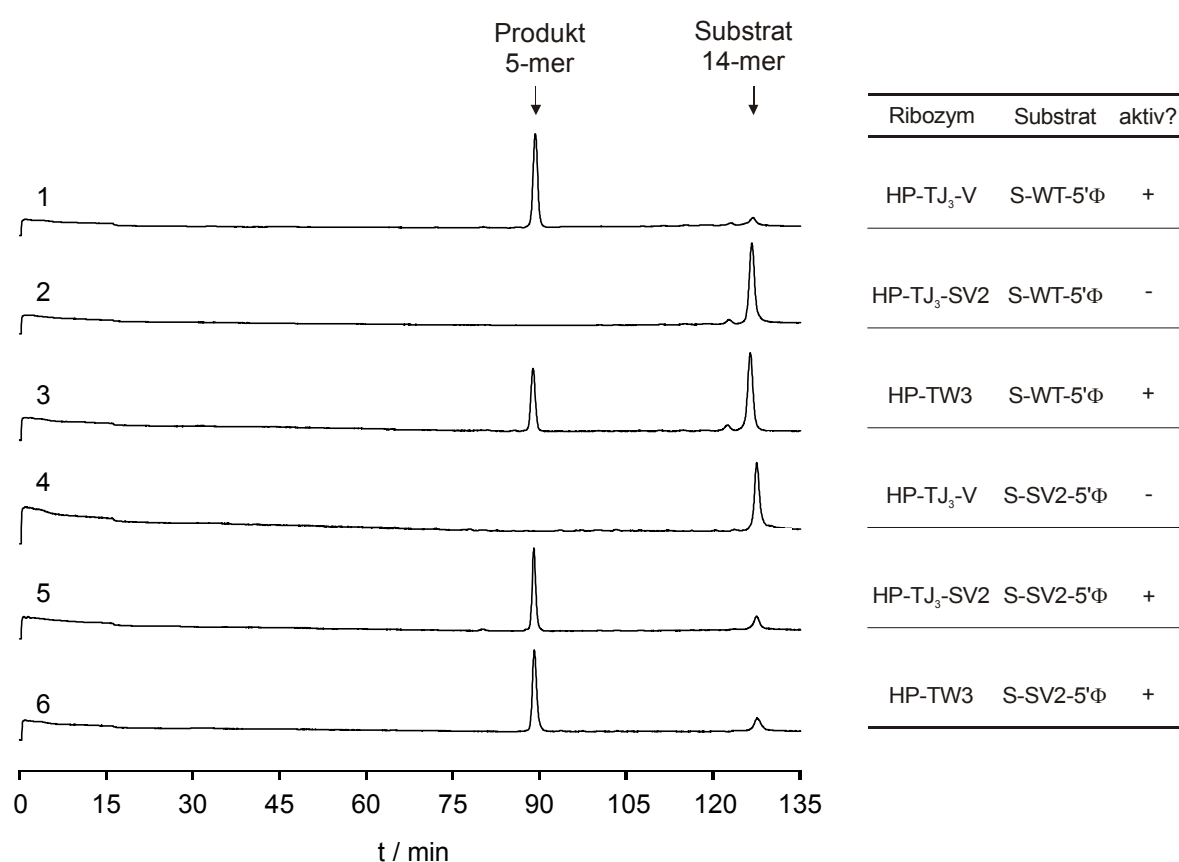


Abb. 44: A.L.F.-Chromatogramme der Spaltexperimente der in Abb. 43 gezeigten Ribozyme mit den Substraten S-WT-5'Φ und S-SV2-5'Φ (Proben nach jeweils 2 h Reaktion unter Standardbedingungen).

Der Beweis für die Doppelspaltaktivität konnte auch für das „Doppelsubstrat“ S-TW3-3'Φ5'Φ erbracht werden, das chemisch synthetisiert und über PAGE gereinigt wurde (s. Kap. 7.2.4.8, S. 107). Es enthält wiederum eine WT- und eine SV2-Spaltstelle (Abb. 45a)

und ist vollständig komplementär zu HP-TW3 (Abb. 41). Zum Vergleich wurden auch die beiden Einzelmotive mit diesem Substrat umgesetzt, damit war folgendes Fragmentmuster zu erwarten: Bei Spaltung durch HP-TJ₃-V sollten ein 13- und ein 35-mer entstehen, bei Spaltung durch HP-TJ₃-SV2 resultieren ein 15- und ein 33-mer, und bei Doppelspaltung

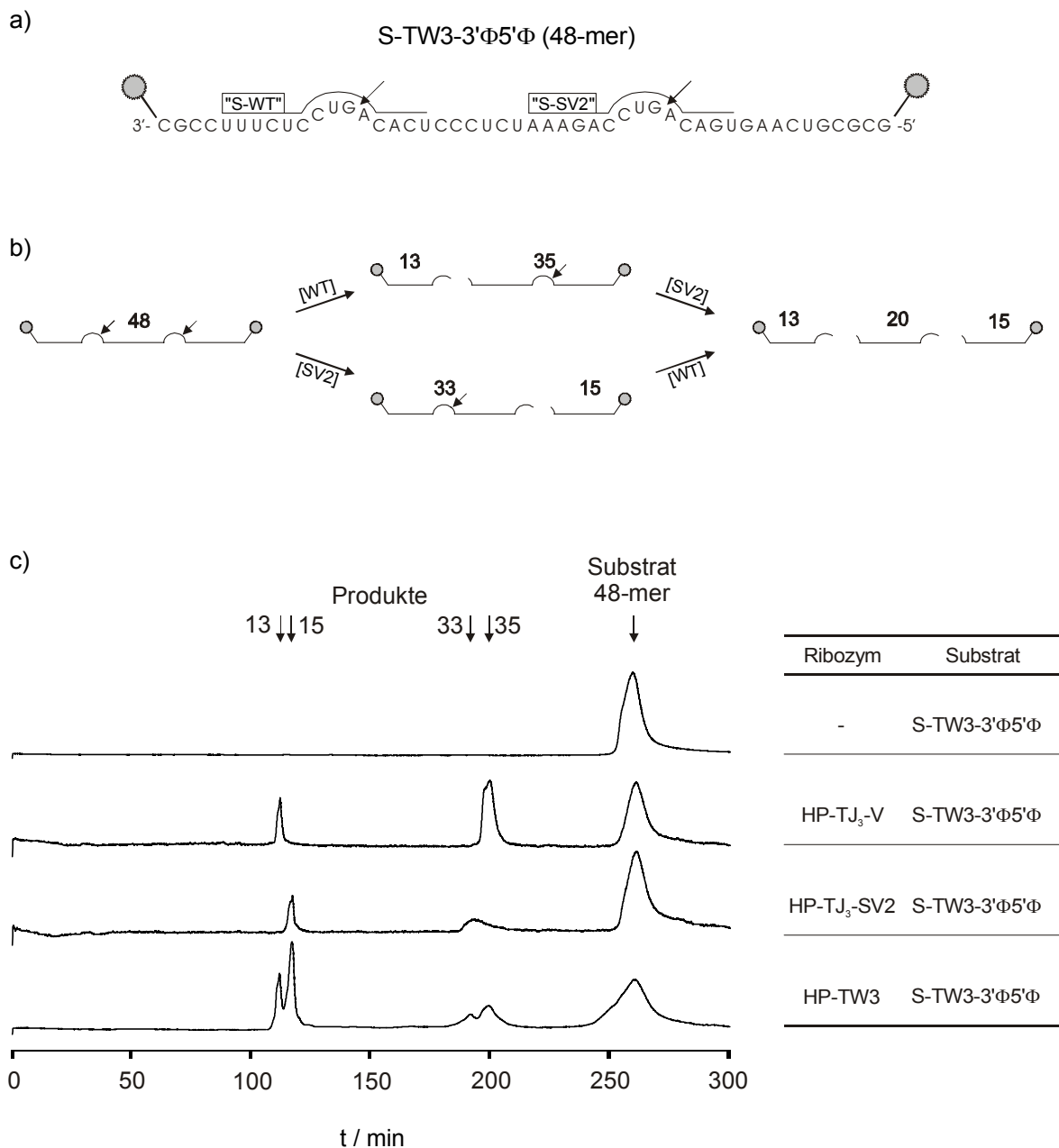


Abb. 45: a) Das Substrat S-TW3-3'Φ5'Φ enthält zwei Spaltstellen, eine mit „WT“- und eine mit „SV2“-Sequenz. b) Schematische Darstellung der entstehenden Fragmente bei einfacher und doppelter Spaltung und c) Rohdaten der Spaltung dieses Substrates durch die in Abb. 43 gezeigten Ribozyme (2 h Reaktionszeit unter Standardbedingungen).

durch HP-TW3 müssten (neben einem unmarkierten 20-mer) alle 4 Fragmente entstehen (Abb. 45b). Die A.L.F-Chromatogramme der Reaktionen der drei Ribozyme mit dem Doppelsubstrat (jeweils 100 nM Ribozym und 200 nM Substrat, 1h Reaktionszeit, ansonsten Standardbedingungen) sind in Abb. 45c gezeigt. Wieder zeigt sich die hochspezifische Spaltung des Substrates durch die Einzelmotive an den zugehörigen Spaltstellen, während HP-TW3 an beiden Orten aktiv ist.

Mit diesen Ergebnissen konnte neben der erfolgreichen chemischen Synthese von HP-TW3 bewiesen werden, dass tandemkonfigurierte Twinribozyme Doppelspaltaktivität zeigen und damit alle strukturellen und funktionellen Voraussetzungen für unseren Reparaturassay besitzen. Leider konnte der eindeutige analytische Nachweis für ein isoliertes 141-mer Produkt aufgrund der Probleme bei der Reinigung solch komplexer Strukturen nicht erbracht werden. Aus diesem Grunde wurde HP-TW3 nicht für Reparaturoperimente eingesetzt. Stattdessen entschieden wir uns, durch weitere Sequenzveränderungen bei den Einzelmotiven den Weg für eine enzymatische Synthese der Twinribozyme gangbar zu machen und dadurch zu definierten Produkte zu kommen.

5.3 Enzymatische Synthese – Zweiter Versuch

5.3.1 Abwandlung der Einzelmotive für die Transkription

Wie in Kapitel 5.1 (S. 67) beschrieben, entsprangen die Probleme bei der primergestützten DNA-Doppelstrangauffüllung der Sequenzgleichheit der B-Domänen beider Einzelmotive. Die Veränderung eines der beiden Einzelribozyme in Helix 3 oder 4, den beiden Bereichen, die entsprechend der Consensussequenz variabel gestaltet werden können, sollte demzufolge zu besseren Ergebnissen führen. Zu diesem Zweck wurden die beiden Einzelmotive HP-TJ₃-V (V = Variante) und HP-TJ₃-SV2 entworfen und auf enzymatischem Weg synthetisiert (Abb. 46). Dabei wurden die Ergebnisse aus Kap. 4.4.2 in Form der verlängerten Helix 4 und einem abschließenden Tetraloop eingearbeitet. Die beiden Ribozyme unterscheiden sich, abgesehen von den Substratbindungsdomänen, vor allem dadurch, dass die unteren 5 Basenpaare der Helix 4 bei HP-TJ₃-V gespiegelt wurden. Außerdem wurde U39 bei HP-TJ₃-SV2 gegen ein Cytidin ausgetauscht, eine Modifizierung, die bei HP-WTL keine Auswirkung hat oder sogar zu leichter Aktivitätssteigerung führt (SCHMIDT *et al.* 1996, SIWKOWSKI *et al.* 1997). Für beide

Ribozyme wurden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} unter *multiple* (10 nM Ribozym und 200 nM Substrat) und *single turnover* Bedingungen (100 nM Ribozym und 10 nM Substrat) bestimmt (Tab. 8), und die gute Übereinstimmung der Aktivitäten erlaubte den direkten Übergang zur Synthese eines Twinribozoms mit diesen beiden Motiven.

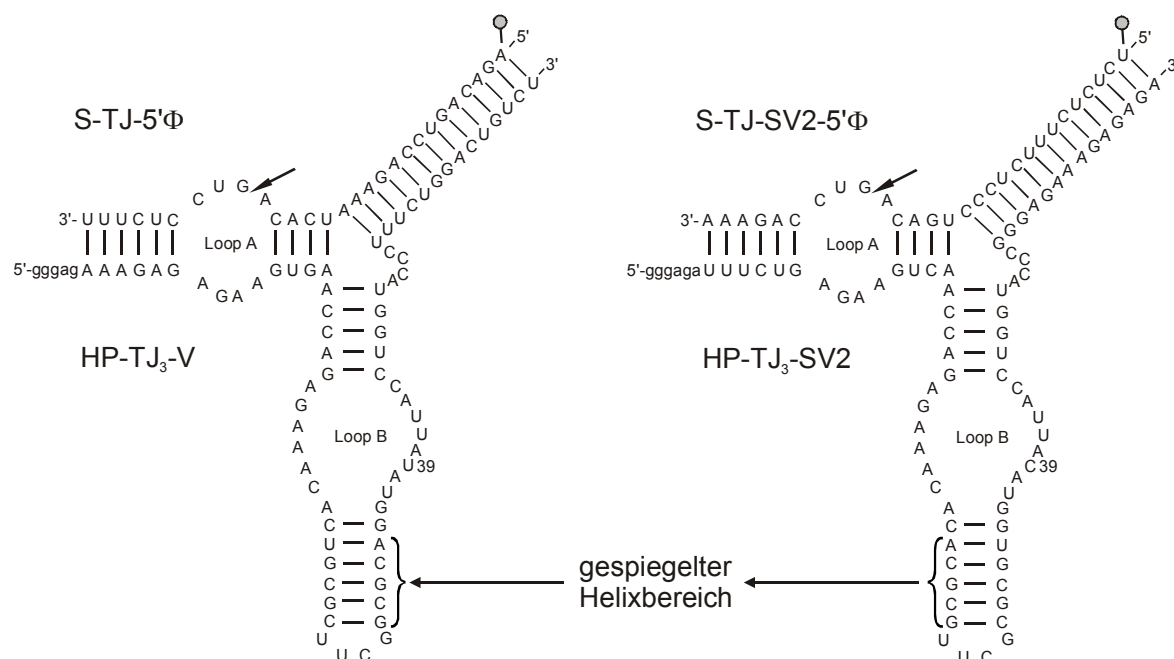


Abb. 46: Sekundärstrukturen der beiden Einzelmotive HP-TJ₃-V und HP-TJ₃-SV2, die als Basis für die enzymatische Synthese des Twinribozoms HP-TW5 entworfen wurden.

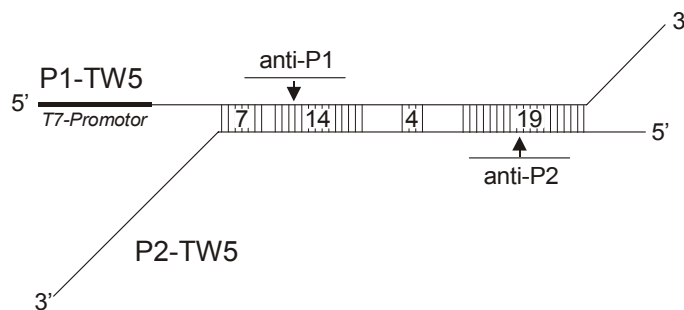
Tab. 8: Vergleich der Spaltaktivität der beiden in Abb. 46 gezeigten Ribozyme (Bedingungen s. 7.2.6, S. 109, Reaktion VII).

| | k_{obs} (multiple turnover) | k_{obs} (single turnover) |
|--|--|--|
| HP-TJ ₃ -V + S-TJ-5'Φ | 0.30 min ⁻¹ | 0.37 min ⁻¹ |
| HP-TJ ₃ -SV2 + S-TJ-SV2-5'Φ | 0.18 min ⁻¹ | 0.15 min ⁻¹ |

5.3.2 Enzymatische Synthese von HP-TW5

Der für die Transkription von HP-TW5 benötigte DNA-Doppelstrang sollte wieder durch enzymatische Auffüllreaktion zweier überlappender Primer synthetisiert werden. Um die Ausbildung unerwünschter Primerkomplexe zu vermeiden, wurden gegenüber dem ersten Versuch (s. Abb. 40, S. 69) mehrere Parameter verändert, wobei die entscheidenden Aspekte des Primerdesigns deutlich werden, wenn man den unerwünschten Duplex betrachtet (Abb. 47a):

a) unerwünschter Duplex



b) erwünschter Duplex



Abb. 47: Konzept des Primerdesigns zur Vermeidung der Ausbildung des unerwünschten (a) und zur Begünstigung des erwünschten Duplexes (b).

Durch die gespiegelte Helix 4 in HP-TJ₃-V (s. letztes Kapitel) ist der komplementäre Bereich schon von zwei Lücken durchsetzt, die genau die 2 mal 5 Nukleotide umfassen, die gespiegelt wurden. Zusammen mit dem Einzelbasenaustausch (U bzw. C an Position 39) bleiben von den ursprünglich 55 nur noch 44 Basenpaarungen (7 + 14 + 4 + 19). Diese unerwünschte Zusammenlagerung wird nun durch 2 zusätzliche 15-mer Primer anti-P1 und anti-P2 weiter destabilisiert (Sequenzen s. Tab. 11, S. 102), die zu Bereichen innerhalb des unerwünschten Duplex komplementär sind und damit um die Bindung an die Primer konkurrieren. Im Falle des gewünschten Duplex (Abb. 47a) binden die beiden Anti-

Stränge in nicht gepaarten Bereichen der Primer. Durch den Einsatz einer DNA-Polymerase mit vorhandener Exonuclease-Aktivität sollten diese kurzen Stränge während der Auffüllreaktion abgebaut werden und somit nicht stören. Außerdem überlappen die beiden 3'-Enden der 99-mer Primer P1-TW5 und P2-TW5 nun um 37 Nukleotide, so dass die Bildung des angestrebten Duplex stark begünstigt sein sollte.

Auf diesem Weg konnten nun Doppelstränge mit voller Länge erhalten werden, deren Transkription aktive Twinribozyme HP-TW5 lieferte, wie im nächsten Kapitel gezeigt wird.

5.3.3 Doppelspaltaktivität des Twinribozyms HP-TW5

Um zu testen, ob HP-TW5 Doppelspaltaktivität aufweist, wurde das Twinribozym einfach mit dem Substrat S-TW3-3'Φ5'Φ umgesetzt, das zwar nicht vollständig komplementär zur Substratbindungsdomäne ist, für erste Untersuchungen aber geeignet erschien (Abb. 48a).

Jeweils 100 nM Ribozym und Substrat wurden unter Standardbedingungen unter Zusatz von 10 mM MgCl₂ (Abb. 48b, Bahn 2) bzw. 10 mM MgCl₂ und 10 mM Spermin (Bahn 3) umgesetzt. In beiden Fällen entwickelte sich das für die Doppelspaltung typische Fragmentmuster (s. Abb. 45), wobei der Spermin-Zusatz die Reaktion(en) offenbar beschleunigte. Der geringe Anteil an 33-mer-Produkt, das durch Spaltung auf der SV2-Seite entsteht und anscheinend sofort an der WT-Stelle zu markiertem 15-mer und unmarkiertem 16-mer weitergespalten wird, deutet auf eine höhere Aktivität für das HP-TJ₃-V-Teilmotiv hin. Beide Ribozymuntereinheiten spalten aber mit vergleichbarer Geschwindigkeit. Mit dem Twinribozym HP-TW5 sollte nun das Ziel der RNA-Reparatur umgesetzt werden.

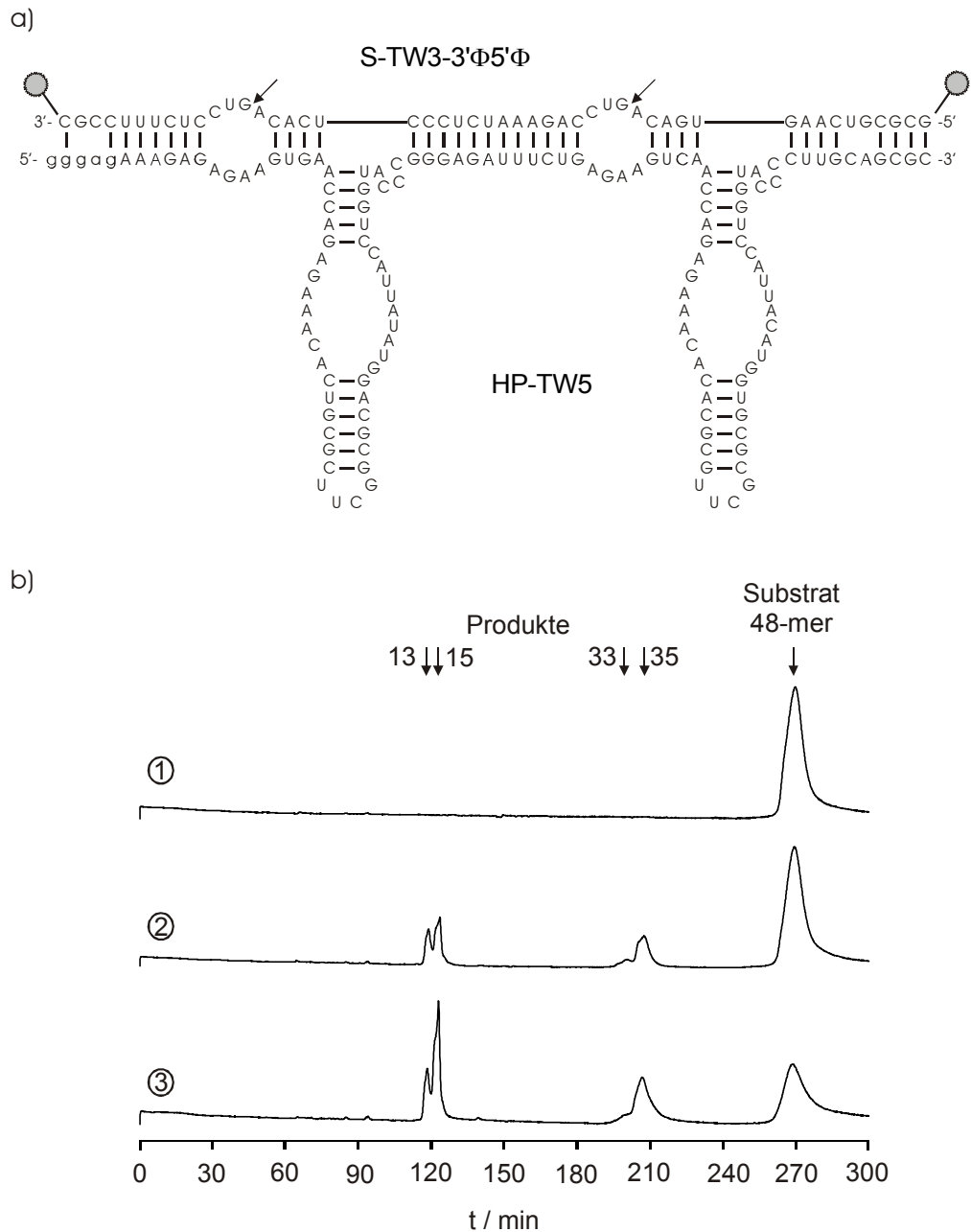


Abb. 48: Doppelspaltung von S-TW3-3'Φ5'Φ durch HP-TW5. a) Sekundärstruktur des Ribozym-Substrat-Komplexes, b) Rohdaten der Spaltreaktion (Proben nach 1 h Spaltung bei 37 °C) – Bahn 1: Substratvergleich, Bahn 2: Reaktion bei 10 mM MgCl₂, Bahn 3: Reaktion bei Zusatz von 10 mM MgCl₂ und 10 mM Spermin.

6 RNA-Reparatur durch ein Twinribozym

6.1 Konzept für den RNA-Fragmentaustausch durch HP-TW5

Die Strategie für die Twinribozym-katalysierte RNA-Reparatur besteht darin, dass nach einer Spaltung an zwei Orten in der Ziel-RNA das mittlere Fragment, das beispielsweise eine Mutation trägt, gegen ein Reparaturoligonukleotid mit korrekter Sequenz ausgetauscht wird. Dabei sollen die endständigen Fragmente am Twinribozym verbleiben, und eine Ligation an den beiden vormaligen Spaltorten führt zu einer Produkt-RNA mit korrigierter Sequenz. Um möglichst hohe Ausbeuten an Reparaturprodukt zu erhalten, muss es für diesen Austausch, also die Verdrängung eines komplementär gebundenen RNA-Stranges durch einen anderen, eine treibende Kraft geben. Im einfachsten Fall wird das Reparaturoligonukleotid im großen Überschuss über den Ribozym-Substrat-Komplex eingesetzt. Es ist aber auch möglich, den Sequenzunterschied zwischen fehlerhafter RNA und (korrigiertem) Reparaturprodukt für den Entwurf eines Twinribozyms zu nutzen, das das auszutauschende RNA-Teilstück schwächer bindet als das Reparaturoligonukleotid. Als Modell für die Reparatur einer Deletionsmutation, dem Fehlen von 4 Basen einer (willkürlich gewählten) RNA-Sequenz, wurde das 45-mer Substrat S-TW5-3' Φ 5' Φ so konstruiert, das es durch HP-TW5 vollständig gebunden wird, während 4 Nukleotide im mittleren Bereich des Twinribozyms ungepaart bleiben und deshalb ausgestülpt vorliegen (Abb. 49). Die Doppelspaltung des Substrates führt zu zwei endständigen, fluoreszeinkmarkierten Fragmenten, die über kontinuierliche Duplexe von 11 bzw. 14 Basenpaaren stabil an HP-TW5 gebunden sind, und zu einem 16-mer, dessen Bindung durch die einzelsträngige Schleife destabilisiert ist und das deshalb leicht vom Ribozymstrang dissoziieren kann. Als Reparaturoligonukleotid wurde das 20-mer FR-TW5 eingesetzt (Tab. 13, S. 102), das um die 4 Basen komplementär zur GAUU-Schleife verlängert ist und dadurch einen kontinuierlichen, stabilen Duplex mit HP-TW5 bildet. Auf diese Weise sollte ein moderater Überschuss an Reparaturoligonukleotid ausreichend sein, um die Bildung des 49-mer Produkts zu begünstigen.

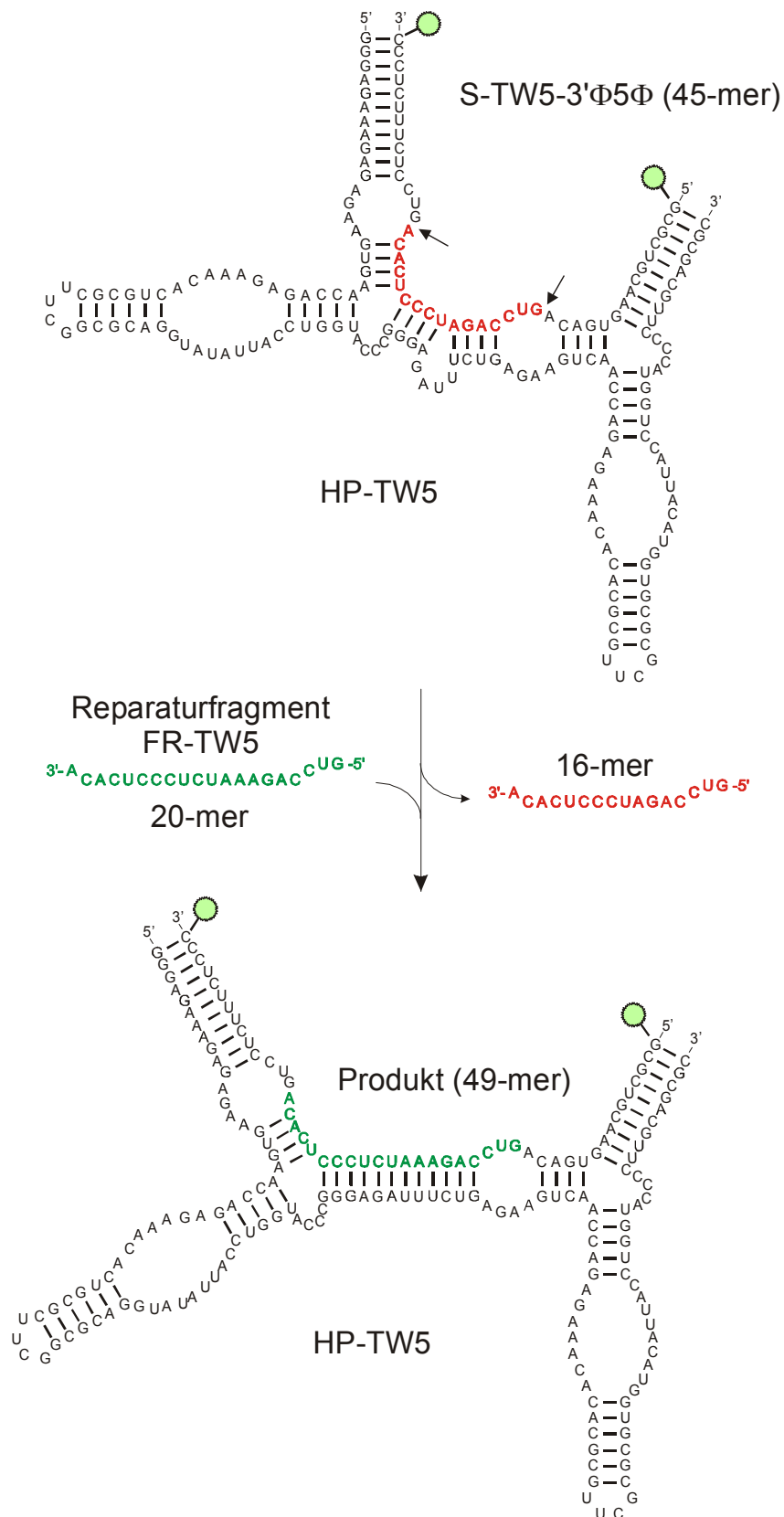


Abb. 49: Modellreaktion für die Reparatur einer Deletionsmutation durch das Twinribosom HP-TW5.

Für die Validierung der Sekundärstruktur des Komplexes aus HP-TW5 und S-TW3'Φ5'Φ wurde das Programm *Mfold* (online unter „<http://mfold.burnet.edu.au/>“) verwendet, die Aktivität des Ribozyms im Komplex mit diesem Substrat sollte durch Spaltexperimente bestätigt werden. Für die Reparaturreaktion sollten Ribozym und Substrat im Konzentrationsverhältnis 1:1 eingesetzt werden, denn ein mehrfacher Substratumsatz war aufgrund der stabilen Bindung an das Ribozym nicht zu erreichen und ein Ribozymüberschuss würde höhere Konzentrationen an zuzusetzendem Reparaturfragment benötigen. Dementsprechend wurden 100 nM Substrat S-TW3'Φ5'Φ jeweils mit 100 nM Ribozym unter verschiedenen Bedingungen umgesetzt: Zum Vergleich wurde das 45-mer mit den Einzelmotiven HP-TJ₃-V und HP-TJ₃-SV2 geschnitten (Abb. 50b, Bahn B und C). Die Reaktionen mit HP-TW5 wurden unter Zusatz von 10 mM (Bahn D) bzw. 100 mM MgCl₂ (Bahn E) sowie 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin (Bahn F) durchgeführt. Dabei wurde zunächst deutlich, dass sich die kurzen Spaltfragmente, das 3'-markierte 14-mer und das 5'-markierte 15-mer, ebenso wie die langen, das 3'-markierte 30-mer und das 5'-markierte 31-mer, nicht mehr in einzelne Signale auflösen lassen. Dies lässt sich zum Teil auf die unterschiedlichen gelelektrophoretischen Eigenschaften der 3'- und 5'-Fluoreszeinmarker (s. Abb. 20, S. 34) zurückführen. Eine Besonderheit, die durch die speziellen Eigenschaften der Spaltprodukte bedingt ist und die ebenfalls Einfluss auf die Gelmobilität der Fragmente hat, wurde erst bei eingehender Analyse des Reaktionsablaufs deutlich: Die bei den Spaltreaktionen gebildeten 5'-Fragmente, das 15- und das 31-mer, tragen am 3'-Ende keine Phosphat-, sondern eine 2',3'-Cyclophosphatgruppe, wodurch die negative Nettoladung dieser RNA-Stränge um jeweils eine Einheit (und damit auch die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld) vermindert wird. Das Verhalten dieser beiden Fragmente bei der Gelelektrophorese tendiert also zu dem eines 14- bzw. 30-mers. An den A.L.F.-Chromatogrammen der Vergleichsreaktionen erkennt man aber auch, dass die 3'-Fluoreszeinmarkierten Fragmente viel kleinere und breitere Signale liefern (das 14-mer in Bahn B und das 30-mer in Bahn C). Durch eine Verlängerung des 45-mer Substrates an einer Seite könnte man die Signale separieren, was zusätzliche Information über die Aktivität der Einzelmotive innerhalb des Twinribozyms liefern würde. Dies war aber für die Durchführung der Reparaturreaktionen nicht unbedingt notwendig, und dass HP-TW5 spezifische Aktivität an beiden Einzelmotiven besitzt, konnte schon mit dem 48-mer S-TW3-3'Φ5'Φ gezeigt werden (s. Kap. 5.3.3, S. 79).

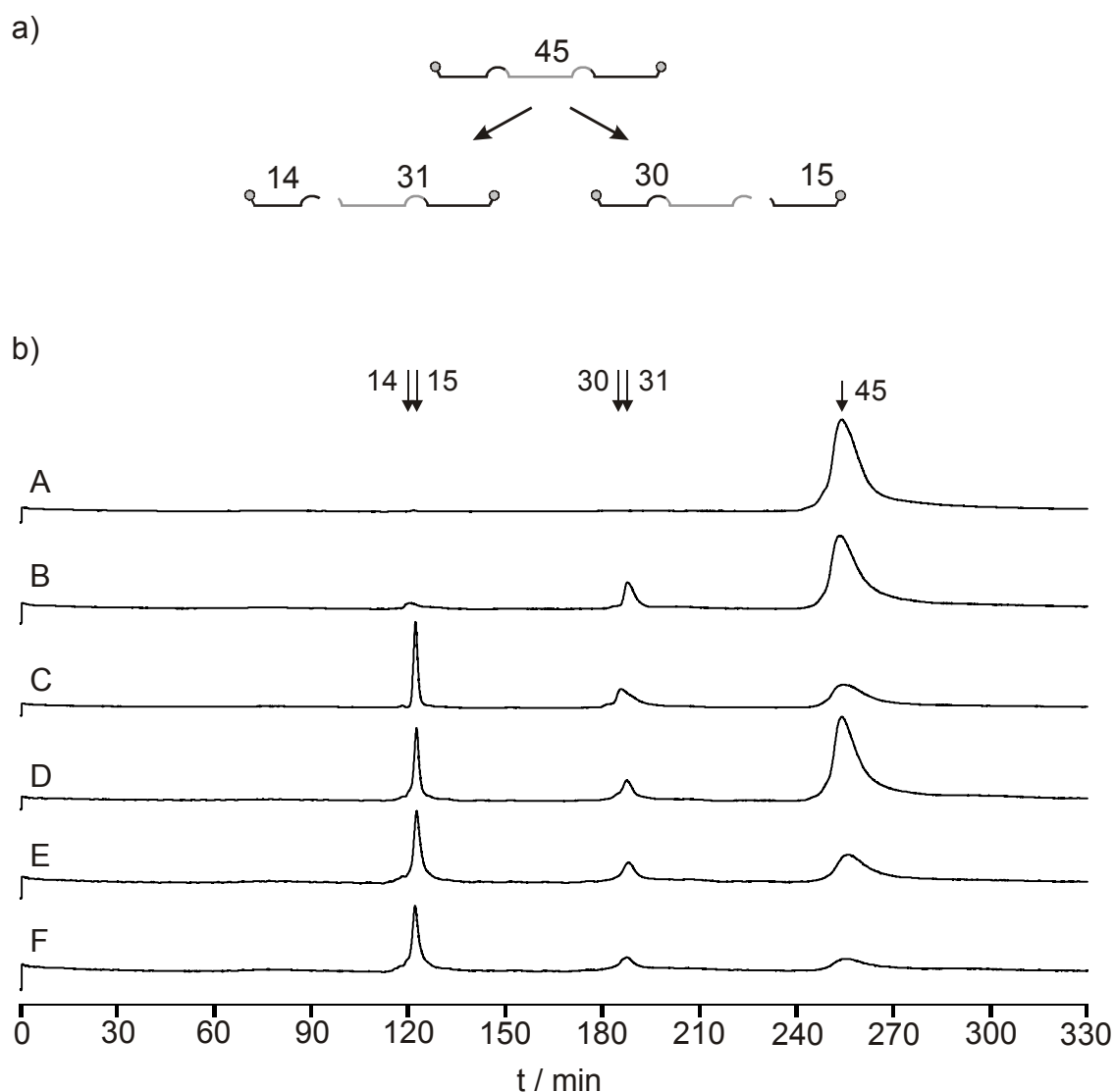


Abb. 50: a) Spaltfragmente des Substrates S-TW5-3'Φ5'Φ, b) A.L.F.-Chromatogramme der Spaltreaktionen (Zeitproben nach 1 h, autoskaliert): A = Substratvergleich; B = HP-TJ₃-V; C = HP-TJ₃-SV2; D, E, F = HP-TW5 mit 10 bzw. 100 mM MgCl₂ sowie 10 mM MgCl₂/2 mM Spermin.

Als optimaler Kofaktorzusatz stellte sich das MgCl₂-Spermin-Gemisch heraus (Bahn F), das ungefähr die gleichen Spaltraten lieferte wie 100 mM MgCl₂ (Bahn E). Unter diesen Umständen ist das Substrat bereits nach 2 h nahezu vollständig gespalten, nach 4 h sind auch die Produkte einseitiger Spaltung, das 30- und das 31-mer, bis zu einem Gleichgewicht in die kürzeren Fragmente abgebaut. Diese Reaktionsbedingungen sollten für die Reparaturversuche Anwendung finden.

6.2 RNA-Reparatur durch HP-TW5

Das für die Reparaturversuche benötigte 20-mer FR-TW5 (Reparaturfragment) muss am 3'-Ende eine für die Ligation erforderliche 2',3'-Cyclophosphatgruppe tragen. Deshalb wurde ein 29-mer S-FR-TW5 durch chemische RNA-Synthese hergestellt und mit HP-WTTLH4 (s. Abb. 36, S. 61) in einem präparativen Ansatz zu einem 9-mer und dem benötigten 20-mer gespalten, das dann mittels Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel isoliert wurde (Abb. 51).

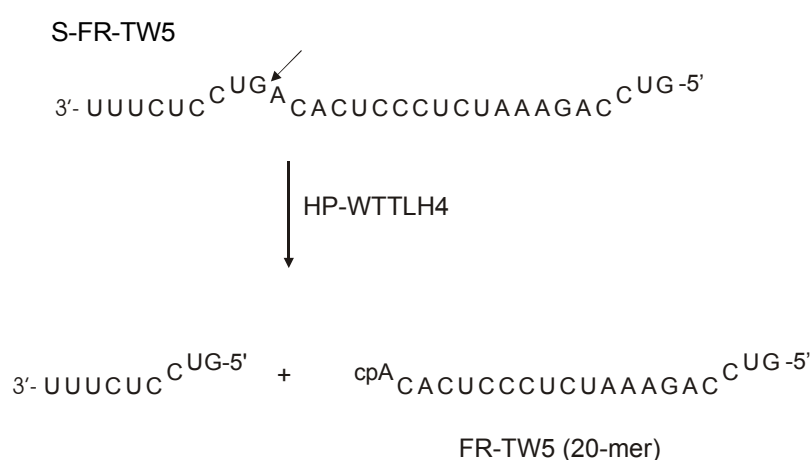


Abb. 51: Erzeugung des Reparaturfragments FR-TW5 durch Spaltung des 29-mers S-FR-TW5 mit HP-WTTLH4 (cp = 2',3'-Cyclophosphat).

Um eine Störung der Ausbildung des HP-TW5/S-TW5-3'Φ5'Φ-Komplexes zu vermeiden, sollten die Reparaturexperimente eine erste Phase der Doppelspaltung durchlaufen, bevor das Reparaturfragment zugegeben wird. Zuerst waren also die typischen Spaltfragmente des 45-mer Substrates zu erwarten (Abb. 52), markierte 14-, 15-, 30- und 31-mere und das unmarkierte 16-mer. Dessen Austausch gegen das 20-mer führt bei einseitiger Ligation zu neuen Fragmenten mit 34 und 35 Nukleotiden Länge (14 + 20 bzw. 15 + 20) und bei beidseitiger Ligation zum 49-mer Reparaturprodukt. Für eine typische Reparaturreaktion wurden je 200 nM Ribozym und Substrat bei 37 °C für 4 h inkubiert, dann mit 2.7 Äquivalenten 20-mer versetzt, weitere 2 h bei 37 °C gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, um die weitere Ligation zum Reparaturprodukt zu begünstigen (7.2.9, S. 118, Reaktion 1).

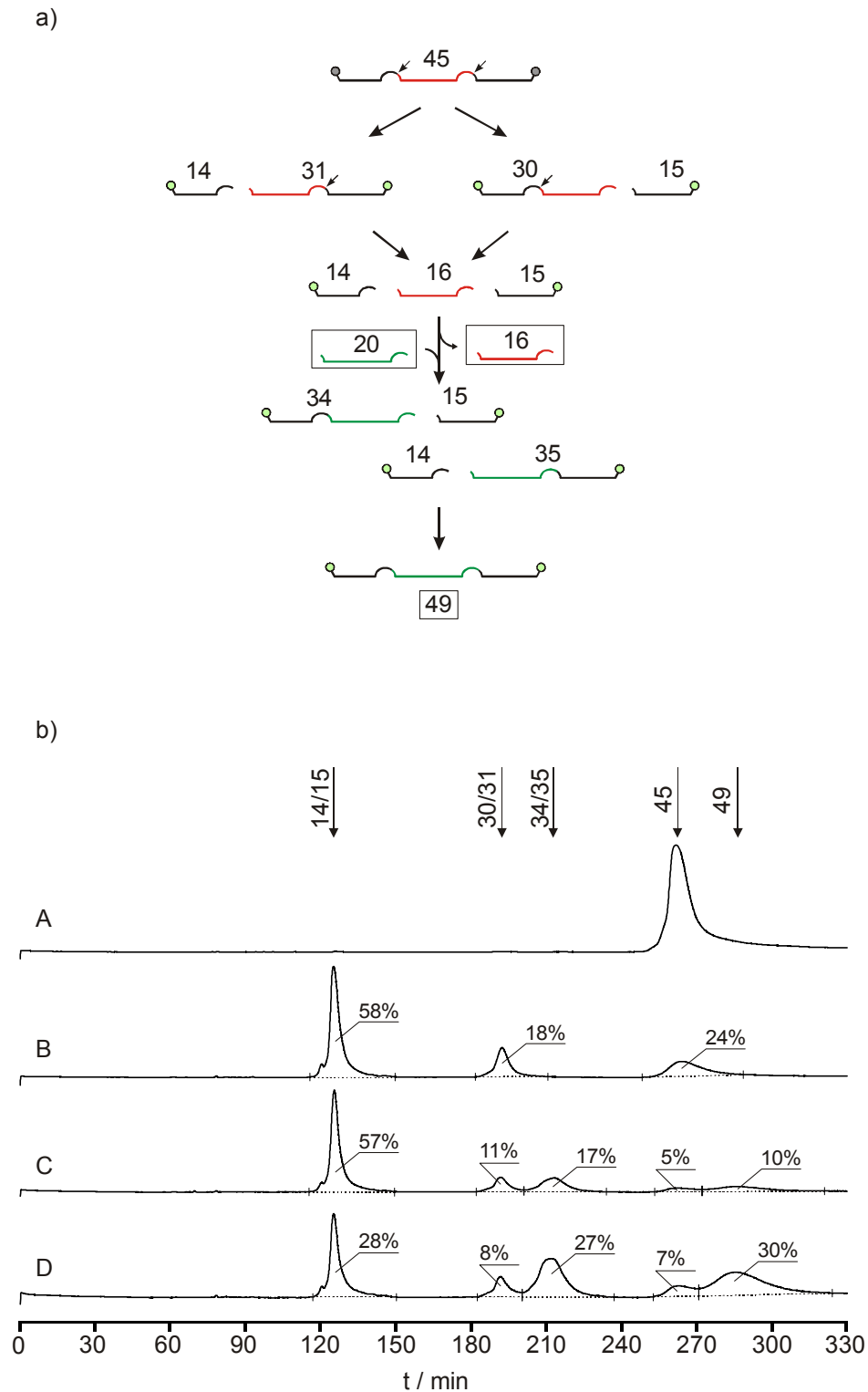


Abb. 52: a) Bei der Reparaturreaktion mit S-TW5-3'Φ5'Φ (45-mer) und FR-TW5 (20-mer, grün) entstehendes Fragmentmuster; b) A.L.F.-Chromatogramme verschiedener Zeitproben der Reparaturreaktion bei Zusatz von 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin: A – Start der Reaktion, B – nach 4 h Spaltung bei 37 °C, C – nach Zugabe des 20-mer Reparaturoligonukleotids und weiteren 2 h bei 37 °C, D – nach zusätzlich 20 h bei Raumtemperatur (autoskalierte Daten, Integrale eingezeichnet).

Abb. 52b zeigt die Rohdaten für die Reaktion bei Verwendung von 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin. Mit den dargestellten Integralen können die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen berechnet werden, wobei zu beachten ist, dass sich aus den Signalen für 14-/15-mer, 30-/31-mer und 34-/35-mer keine Konzentrationen ableiten lassen, da der Anteil an 3'- und 5'-fluoreszeinmarkierten RNAs in diesen Fraktionen nicht bekannt ist. Sowohl für das 45-mer Ausgangssubstrat als auch für das 49-mer Reparaturprodukt gilt jedoch, dass genau gleiche Mengen beider Marker enthalten sind, ebenso enthält die Summe der anderen 3 Signale gleiche Mengen der beiden Marker. Damit lassen sich zumindest für 45-mer und 49-mer eindeutige Konzentrationen ableiten.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ war nur das 45-mer Ausgangssubstrat vorhanden (Bahn A), nach 4 h Spaltung war es weitgehend zu den genannten Standardprodukten gespalten (Bahn B). An dieser Stelle erfolgte die Zugabe des 20-mers, nach weiteren 2 h bei 37 °C waren zwei neue Signale zu beobachten (bei etwa 210 und 290 min Retentionszeit), die den 34-/35-mer Ligationsprodukten und dem 49-mer Reparaturprodukt zugeordnet werden konnten (Bahn C). Dabei erklärt sich das Einzelsignal für die 34- und 35-mer Fragmente genau wie bei den Spaltfragmenten 14- und 15-mer bzw. 30- und 31-mer (Kap. 6.1). Nach weiteren 20 h bei Raumtemperatur stiegen die Anteile der Ligationsprodukte (einschließlich des 45-mer Substrates, das wieder zurückgebildet wurde), bis am Ende rund 30 % des Ausgangssubstrates in das Reparaturprodukt überführt worden waren (Bahn D). Mit diesem Ergebnis erwies sich die Strategie der Twinribozym-katalysierten RNA-Reparatur als überaus erfolgreich. Selbst nach zwei Stunden Ligation bei 37 °C, also unter physiologischen Bedingungen, waren bereits 10 % an 49-mer gebildet.

Tab. 9: Vergleich der Ausbeute an Reparaturprodukt bei verschiedenen Kofaktorkonzentrationen.

| Kofaktor (mM) | | 49-mer (%) | 49-mer (%) |
|-------------------|---------|-------------------------------|--------------------|
| MgCl ₂ | Spermin | (nach 2 h Ligation bei 37 °C) | (nach 20 h bei RT) |
| 10 | - | 6 | 16 |
| 100 | - | 10 | 24 |
| 10 | 2 | 10 | 30 |
| 10 | 10 | 3 | 6 |
| 100 | 10 | 3 | 6 |

Es wurden weitere Versuche unter Variation der Kofaktorkonzentrationen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 9 zusammengefasst sind. Wurde kein Spermin zugesetzt, dann ergaben sich erst bei 100 mM MgCl_2 Produktmengen, die denen der optimalen Reaktion bei 10 mM MgCl_2 und 2 mM Spermin vergleichbar sind. Auch eine Erhöhung der Konzentration an Spermin auf 10 mM führte zu schlechteren Ergebnissen. Neben diesen Experimenten wurde auch der Einfluss der Tris-Konzentration auf die Reparaturreaktion untersucht, jedoch wurden im Bereich von 5 bis 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), jeweils unter Zusatz von 100 mM MgCl_2 , immer gleiche Produktausbeuten erhalten.

Die Optimierung der Einzelmotive hinsichtlich der Sperminakzeptanz als Kofaktor (s. Kap. 4.4.2) hat offenbar dazu geführt, dass das Polyamin (im Gemisch mit MgCl_2) im Twinribozym nicht nur toleriert wird, sondern optimale Spalt- und Ligationsergebnisse hervorbringt. Dies scheint besonders im Hinblick auf mögliche in vivo Anwendungen von Vorteil zu sein, denn die eingesetzten Kofaktorkonzentrationen liegen im Bereich der Konzentrationen in Säugerzellen (HERDER 1995).

6.3 Analytischer Nachweis des Reparaturprodukts

Der Beweis der erfolgreichen RNA-Reparatur durch HP-TW5 sollte über die eindeutige Identifizierung des 49-mer Produkts durch RNA-Sequenzierung erfolgen. Dafür wurde die im letzten Kapitel beschriebene optimale Reaktion mit fünffacher Substanzmenge wiederholt, und nach Reaktionsende wurde der gesamte Ansatz auf die 40 Taschen des Polyacrylamidgels verteilt, das für die Analyse der Ribozymreaktionen im A.L.F.-Sequenzierautomaten eingesetzt wird (s. Kap. 3.1.2). Der Elektrophoreseverlauf wurde online verfolgt und die Elektrophorese gestoppt, als das 49-mer Produktsignal erschien (Abb. 53a). Nun wurde auf Höhe des Photodiodenarrays über die ganze Breite ein Gelstreifen ausgeschnitten, der die Produkt-RNA enthalten sollte.

Die Sequenzierung des auf diese Weise isolierten Produkts wurde von Christian Klug durchgeführt, einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fritz an der Georg-August-Universität in Göttingen.

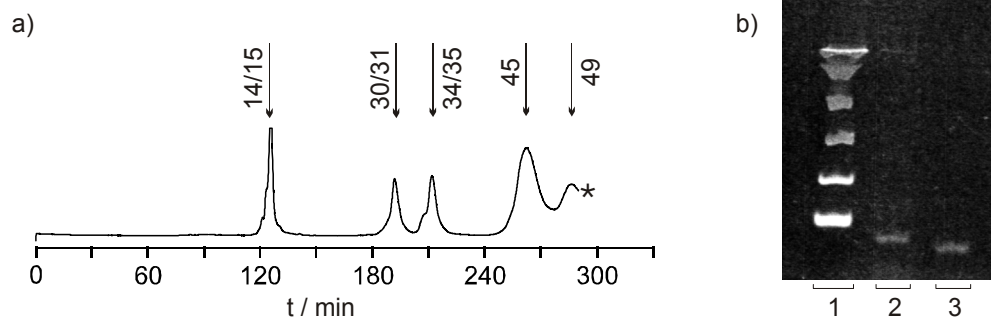
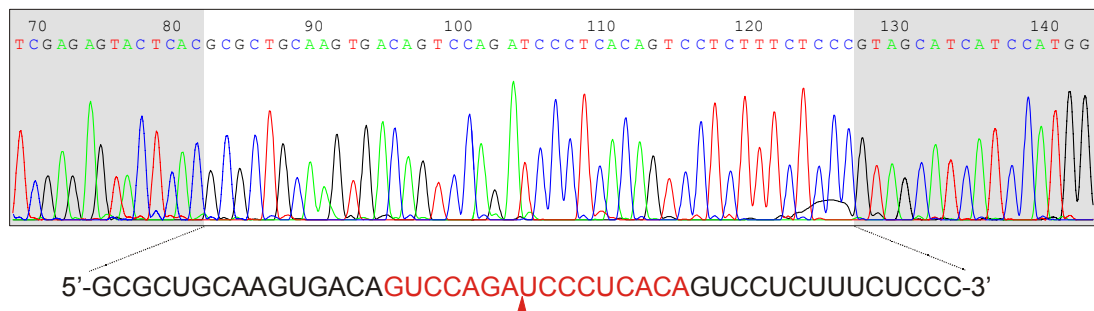


Abb. 53: a) A.L.F.-Chromatogramm des präparativen Reparaturansatzes, an der mit einem Stern markierten Stelle wurde die Gelelektrophorese gestoppt. b) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte: Bahn 1 – DNA-Vergleiche, von unten 110, 147, 190, 242, 331 und 404 bp; Bahn 2 – PCR-Produkt der cDNA, die durch reverse Transkription aus dem 49-mer gewonnen wurde, das zuvor aus dem in (a) gezeigten präparativen Gel eluiert worden war (erwartete Länge: 96 bp); Bahn 3 – PCR-Produkt der von der Substrat-RNA durch reverse Transkription gewonnenen cDNA (erwartete Länge: 92 bp).

a) S-TW5-3'Φ5'Φ



b) Reparaturprodukt

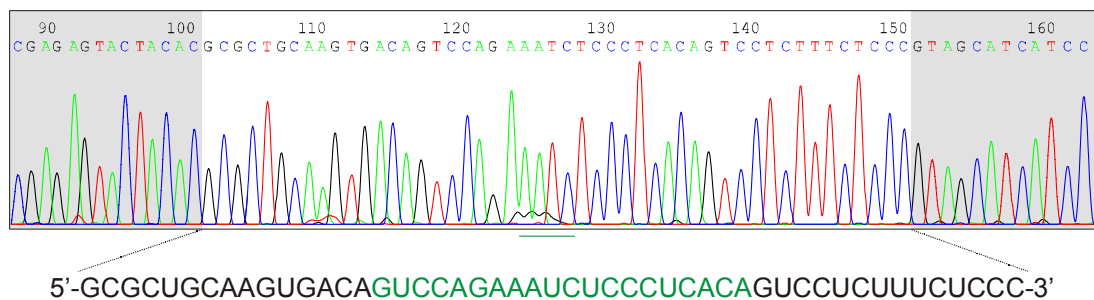


Abb. 54: DNA-Sequenzanalyse für die aus dem Substrat (45-mer, a) und aus dem Produkt der Reparatur (49-mer, b) generierten PCR-Produkte. Das mittlere Fenster zeigt die Sequenz der Substrat- bzw. Produkt-RNA wie unter den jeweiligen Kurven verdeutlicht; die flankierenden Sequenzen stammen von den PCR-Primern. Das 16-mer, das in der Substratsequenz durch die Reparaturreaktion ersetzt wird, ist in Rot angegeben, die Sequenz des zur Reparatur verwendeten 20-mers in Grün. Innerhalb der Substratsequenz markiert der rote Keil den Zielpunkt der RNA-Reparatur, in der Produktsequenz sind die eingefügten Nukleotide unterstrichen.

Dazu wurde die RNA aus dem Gel eluiert, revers transkribiert und die resultierende cDNA durch PCR amplifiziert (s. Abb. 53b), geklont und sequenziert (WELZ *et al.* 2003). Zum Vergleich wurde auch S-TW5-3'Φ5'Φ auf die gleiche Weise behandelt und sequenziert (ohne vorherige gelchromatografische Trennung).

Die Sequenzierdaten in Abb. 54 zeigen einmal die korrekte Sequenz für das 45-mer Ausgangssubstrat (a), und zum anderen die des Reparaturprodukts, bei dem die 4 zusätzlichen Nukleotide an der richtigen Stelle eingefügt sind (b). Dies beweist, dass S-TW5-3'Φ5'Φ in gewünschter Weise durch HP-TW5 prozessiert wurde.

6.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen

Anhand der Modellreaktion für die Reparatur einer Deletionsmutation konnte die Validität des Twinribozym-Ansatzes demonstriert werden. Mit HP-TW5 lassen sich 4 Nukleotide an definierter Stelle in die Substrat-RNA S-TW5-3' Φ 5' Φ einfügen. Damit wurde zunächst ein Werkzeug für die Manipulation von RNA-Strängen *in vitro* entwickelt. Die Struktur des Twinribozyms erlaubt dabei einmal die Anpassung an verschiedene Zielsequenzen, weil die Substrat-RNA über einen weitgehend sequenz-variablen Teil des Ribozyms gebunden ist. Zum anderen lässt sich über die Länge der äußeren und auch der inneren substratbindenden Helices die Stabilität der Bindungen zwischen Ribozym und dem Substrat bzw. den Produkt- und Reparaturfragmenten steuern. Dies erlaubt möglicherweise die Steigerung der Ausbeute an Reparaturprodukt, außerdem kann das System auf diese Weise auf Anforderungen für mögliche *in vivo* Experimente abgestimmt werden. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass sich das prinzipielle Design auch auf die Reparatur anderer RNA-Defekte, wie Punktmutationen oder Insertionen ausrichten lässt. Die Sequenzunterschiede zwischen defektem und einzufügendem Fragment ließen sich derart ausnutzen, dass das Reparaturfragment durch vollständige Watson-Crick-Basenpaarung stärker gebunden wird, als ein über Wobble- oder Fehlpaarungen gebundenes, auszutauschendes Fragment.

Um das Potential der Twinribozym-katalysierten RNA-Reparatur in Bezug auf therapeutische Anwendungen zu verdeutlichen, seien abschließend zwei Beispiele für bekannte Krankheiten genannt, die durch die erwähnte Art von Gendefekten verursacht werden: Mukoviszidose (auch Cystische Fibrose, häufigste Erbkrankheit in Europa) wird durch Deletion von drei Basenpaaren im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) bewirkt, in deren Folge ein um ein Phenylalanin verkürzter, defekter Chlorid-Ionenkanal expremiert wird (RIORDAN *et al.* 1989). Die Sichelzellanämie hingegen beruht auf Punktmutationen im Gen für die β -Kette des Hämoglobins, in deren Folge ein Glutamat- gegen einen Valin- oder Lysinrest ausgetauscht wird. Beide Krankheiten sind damit potentielle Anwendungsziele für einen therapeutischen Einsatz von Twinribozymen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien

7.1.1 Labor- und Feinchemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, solange nicht anders beschrieben, von den Firmen Aldrich, Fluka oder Merck bezogen und entsprachen für chemische Arbeiten mindestens der Reinheitsnorm p.a., für biochemische Arbeiten mindestens der Reinheitsnorm „für die Molekularbiologie“.

Alle verwendeten Puffer und Gellösungen wurden steril filtriert.

7.1.2 Enzyme

| | |
|---|-----------|
| DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, exo ⁻) | Fermentas |
| DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) | Fermentas |
| T7 RNA-Polymerase | Fermentas |

7.1.3 Trennmaterialien

| | |
|--|----------------------|
| NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. (19:1) 40 % | Roth |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. (19:1) 40 % | Roth |
| MonoQ HR 5/5, 50 x 5 mm, 10 µm | Pharmacia |
| PL-SAX 1000 Å, 8 µm, 150 x 7.5 mm | Polymer Laboratories |
| Sephadex G25 | Pharmacia |
| Hi Trap TM Streptavidin HP-Säulen | Amersham Pharmacia |

7.1.4 Geräte

| | |
|--|---|
| DNA-/RNA-Synthesizer: | Gene Assembler Special, Pharmacia |
| Gelelektrophorese: | MIDGET 2050 Elektrophoresesystem, Pharmacia A.L.F. DNA-Sequenzierautomat, Pharmacia |
| HPLC: | Gerätesystem LC6A, Shimadzu Gerätesystem ICI, GAT |
| UV/VIS-Spektroskopie: | Specord UV 160, Shimadzu Spectrophotometer Cary 1, Varian |
| ^1H - und ^{13}C -NMR: | Bruker AM 300 |
| Massenspektrometrie: | Finnigan LCQ Deca, ESI Varian MAT 95, ESI |
| Zentrifugation: | Kühlzentrifuge 3K30, Sigma Biofuge 13, Heraeus Sepatech |
| Lyophilisation: | Univapo 100H, UniEquip Alpha 1-2, Christ SpeedVac SC 110 |

7.2 Arbeitsvorschriften

7.2.1 Chemische RNA-Synthese und Reinigung

7.2.1.1 Synthese von 5-Benzylmercaptotetrazol

Alle Versuche zur Synthese von BMT unter verschiedenen Bedingungen (Tab. 1, S. 23) folgten dem gleichen Protokoll. Exemplarisch sei hier die Vorschrift für den Ansatz mit

der besten Ausbeute beschrieben (bei verschiedenen Ansatzgrößen wurden die Mengen aller Komponenten angepasst).

In einem 500 ml Kolben wurden 74.5 g Benzylthiocyanat (0.5 mol), 39.8 g Natriumazid (1.225 Ä) und 69.5 g Ammoniumchlorid (1.3 Ä) in einem Gemisch aus 240 ml Dioxan und 60 ml Wasser aufgenommen, mit Raschigringen (Glas, 4 mm x 4 mm) versetzt und mit einem leistungsfähigen Magnetprüher 4 Tage bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit konz. HCl auf pH \approx 2 gebracht (pH-Papier) und mit 200 ml CH₂Cl₂ und 100 ml H₂O in einem Schütteltrichter geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch 2-mal mit je 200 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte wurden wiederum 3-mal mit 100 ml 5%iger NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Aus den somit erhaltenen wässrigen Phasen wurde nun durch langsames Ansäuern mit konz. HCl bis pH \approx 2 (CO₂-Entwicklung) das Produkt ausgefällt, mit einer Fritte abgesaugt, mit ca. 200 ml destilliertem Wasser gewaschen und im Exsikkator erst unter Vakuum, später über KOH getrocknet.

Ausbeute: 65 g eines weißen, kristallinen Feststoffs (72 %)

Analytische Daten:

MS (ESI): m/z 192.1 (M=192.24 g/mol)

EA: theoretisch (%): C 49.98 H 4.19 N 29.14 S 16.68

gefunden (\pm 0.3 %): C 50.10 H 4.06 N 29.01 S 16.60

¹H-NMR (CD₃CN): δ (ppm) 4.26 (2H, s, CH₂), 7.05 (5H, m, aromatic)

¹³C-NMR (CD₃CN): δ (ppm) 38.2 (CH₂), 127.7/128.1/128.8 (CH), 137.0 (phenyl C), 160.6 (tetrazole)

7.2.1.2 Festphasensynthese von RNA

Für die automatische Festphasensynthese der Oligoribonukleotide wurden 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-TBDMS-geschützte β -Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidite von Amersham Pharmacia Biotech verwendet, die an den exocyclischen Aminofunktionen der Nukleobasen Schutzgruppen tragen, welche bereits unter milden Bedingungen abspaltbar sind (*N*⁶-phenoxyacetyl-A, *N*²-4-*i*-propyl-phenoxyacetyl-G, *N*⁴-acetyl-C, U). Als Trägermaterial wurde Polystyren (500 Å Porenweite, Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt, das über einen Succinat-Linker mit dem 3'-terminalen Nukleosid beladen war. Nur für HP-TW3 (141 nt) wurde ein 1000 Å DNA-Träger auf CPG-Basis (*Controlled Pore*

Glass) verwendet (dT, Glen Research), der auch für Sequenzlängen > 100 Nukleotide geeignet ist. Die Synthesen wurden im 1 µmol Maßstab unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Standardzyklen durchgeführt. Für die Synthese unter Tetrazolaktivierung waren die Eckwerte 12 min Kupplungszeit, 200facher Überschuss an Tetrazol und 15facher Überschuss des zu koppelnden Phosphoramiditbausteins über die Festphase. Bei Verwendung von BMT als Aktivator wurde das gleiche Protokoll benutzt, jedoch mit verkürzter Kupplungszeit von 3 min und vermindertem Überschuss an Aktivator (100fach) und an Phosphoramidit (8fach). Alle RNA-Synthesen wurden „trityl off“ durchgeführt, d.h. nach dem letzten Kupplungsschritt wurde die DMTr-Schutzgruppe am 5'-Ende abgespalten.

Nach der Synthese erfolgte die Abspaltung der Basenschutzgruppen, der β-Cyanoethylschutzgruppen und des gesamten Oligonukleotids vom Träger durch Einwirkung von ammoniakgesättigtem Methanol bei Raumtemperatur für 15 h. Die ammoniakalische Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, der Rückstand mit 800 µl Triethylamin-trihydrofluorid in DMF (3:1) versetzt und für 1.5 h auf 55 °C erwärmt, um die 2'-O-TBDMS-Schutzgruppen zu entfernen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Wasser gestoppt und die RNA-Rohprodukte wurden mit 50 ml Butanol gefällt (s. 7.2.4.4).

7.2.1.3 Endmarkierung von RNA-Strängen

Die Fluoreszeinmarkierung von Oligonukleotiden wurde unter Verwendung kommerzieller Marker durchgeführt. Im Falle der 3'-Endmarkierung wurde ein Fluoreszein-beladener CPG-Träger (Glen Research, s. ABBX) eingesetzt, an dem das gewünschte Oligonukleotid schrittweise in 5'-Richtung synthetisiert wurde. Die Markierung am 5'-Ende erfolgte im letzten Schritt einer Oligonukleotidsynthese durch eine 0.1 M Lösung eines Fluoreszeinphosphoramidits (Parmacia, s. Abb. 20, S. 34) unter gleichen Bedingungen, wie bei einem normalen Synthesekyklus.

7.2.1.4 Reinigung der synthetisierten RNAs

Die Reinigung der chemisch synthetisierten Oligoribonukleotide erfolgte entweder durch Anionenaustausch-HPLC oder durch Gelelektrophorese. Für die HPLC wurden eine PL-

SAX 1000 Säule (7.5 x 150 mm) oder eine MonoQ HR 5/5 Säule (5 x 50 mm) mit folgenden Puffern und Gradienten verwendet:

- A:** Säule: MonoQ HR 5/5
Puffer A: 20 mM NaOAc, pH 6.5, 20 % Acetonitril
Puffer B: 20 mM NaOAc, pH 6.5, 20 % Acetonitril, 1 M KCl
Flussrate: 1 ml/min
Gradient: linear, 0-20 % B über 2 min, 20-80 % B über 43 min, 80-100 % B über 5 min
- B:** Säule: PL-SAX
Puffer A: 20 mM NaOAc, pH 6.5, 20 % Acetonitril
Puffer B: 20 mM NaOAc, pH 6.5, 20 % Acetonitril, 1 M LiCl
Flussrate: 1 ml/min
Gradient: linear, 0-100 % B über 30 min
- C:** Säule: PL-SAX
Puffer A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6.3, 25 % Formamid
Puffer B: 20 mM KH₂PO₄, pH 6.3, 25 % Formamid, 1 M KCl
Flussrate: 1 ml/min
Gradient: linear, 0 % B 0-100 % B über 30 min
- D:** Säule: PL-SAX
Puffer A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6.3, 25 % Formamid
Puffer B: 20 mM KH₂PO₄, pH 6.3, 25 % Formamid, 1 M LiCl
Flussrate: 1 ml/min
Gradient: linear, 0-100 % B über 30 min

E: Säule: PL-SAX
Puffer A: 20 mM KH_2PO_4 , pH 6.3, 25 % Formamid
Puffer B: 20 mM KH_2PO_4 , pH 6.3, 25 % Formamid, 1 M KCl
Flussrate: 1 ml/min
Gradient: linear, 0-100 % B über 30 min

Die produkthaltigen Fraktionen der präparativen HPLC wurden gesammelt und in Abhängigkeit vom Salz, das für die Elution verwendet wurde, auf folgende Weise behandelt:

- Die Eluate, die mit KCl-Gradienten erhalten wurden (Systeme A, C und E), wurden durch Dialyse gegen Wasser entsalzt (s.7.2.4.6) und zur Trockne lyophilisiert. Abschließend wurde der Rückstand in 500 μl Wasser aufgenommen und einer Ethanolfällung unterzogen (s. 7.2.4.3).
- Die im LiCl-Gradienten eluierten Sequenzen (Systeme B und D), wurden zuerst durch Lyophilisation bis zur Trockne eingengt und dann in soviel Wasser aufgenommen, dass eine Lösung mit 4 M LiCl entstand. Daraus wurden die RNAs mittels Ethanol/Aceton gefällt (7.2.4.5).

Syntheseprodukte, die sich mittels HPLC nicht ausreichend auftrennen ließen, wurden durch Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen gereinigt (7.2.4.1). Dafür wurden 15-20%ige Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)-Gellösungen mit 7M Harnstoff verwendet, aus denen 1.5 mm dicke Gele hergestellt wurden. Die Proben wurden in Formamidpuffer (98 % Formamid in 10 mM wässriger EDTA-Lsg. v/v, 0.05 % Bromphenolblau oder 0.05 % Xylencyanol) bei einer Beladungsdichte von 1-5 O.D.₂₅₄ pro cm aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 20 V/cm, die Produktbanden wurden anschließend im UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Die RNA wurde durch 3-malige Zugabe von ca. 10 μl Elutionspuffer pro mm^3 aus den Gelstücken eluiert (0.5 M LiOAc, 50 mM Tris·HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) und die RNA durch Ethanolfällung aus den vereinigten Elutionslösungen gefällt (s.7.2.4.3).

Tab. 10 gibt eine Aufstellung aller chemisch synthetisierten RNAs.

Tab. 10: Chemisch synthetisierte RNA-Stränge.

| Name | Länge | Sequenz (5'→3') | Aktivator | Reinigung ¹⁾ | Ausbeute ²⁾ |
|--------------|--------|---|--------------|-------------------------|------------------------|
| RzA | 21 nt | CGC GUG GUA UAU UAC CUG GUA | Tetrazol/BMT | E | 32 / 102 nmol |
| S-WT-5'Φ | 14 nt | Φ- UCA CAG UCC UCU UU | Tetrazol | A | 42 nmol |
| S-TJ-5'Φ | 28 nt | Φ- AGA CAG UCC AGA AAU CAC AGU CCU CUU U | Tetrazol | A | 30 nmol |
| S-TJ-3'Φ | 28 nt | AGA CAG UCC AGA AAU CAC AGU CCU CUU U -Φ | Tetrazol | B | 26 nmol |
| 3'-SP-WT+5 | 14 nt | GUC CUC UUU CUC CC -Φ | BMT | C | 305 nmol |
| 3'-SP-WT-3'Φ | 9 nt | GUC CUC UUU -Φ | BMT | C | 425 nmol |
| 3'-SP-WT | 9 nt | GUC CUC UUU | BMT | C | 375 nmol |
| S-SV1-5'Φ | 14 nt | Φ- AGA CAG UCC AGA AA | Tetrazol | D | 45 nmol |
| S-SV2-5'Φ | 14 nt | Φ- UGA CAG UCC AGA AA | BMT | D | 20 nmol |
| S-SV4-5'Φ | 16 nt | Φ- UGU GUU GUC UGC CCG U | BMT | D | 32 nmol |
| S-TJ-SV2-5'Φ | 28 nt | Φ- UCU CUC UUU CUC CCU GAC AGU CCA GAA A | BMT | D | 103 nmol |
| HP-TW3 | 141 nt | GCC GAA AGA GAG AAG UGA ACC AGA GAA ACA CUG CGC UUC GGC GCA GGU AUA UUA CCU GGU ACC CGG GAG AUU UCU GAG AAG UCA ACC AGA GAA ACA CAC GCG UUC GCG CGU GGU ACA UUA CCU GGU ACC CCU UGA CGC GC dT | BMT | s. 7.2.4.8, S. 107 | - |
| S-TW3-5'Φ3'Φ | 48 nt | Φ- GCG CGU CAA GUG ACA GUC CAG AAA UCU CCC UCA CAG UCC UCU UUC GGC -Φ | BMT | Gel | 17 nmol |
| S-TW5-5'Φ3'Φ | 45 nt | Φ- GCG CUG CAA GUG ACA GUC CAG AUC CCU CAC AGU CCU CUU UCU CCC -Φ | BMT | Gel | 26 nmol |
| S-FR-TW5 | 29 nt | GUC CAG AAA UCU CCC UCA CAG UCC UCU UU | BMT | Gel | 35 nmol |

¹⁾ A-E: HPLC im entsprechendem Puffer- und Gradientensystem, Gel: Gelelektrophoretische Reinigung; ²⁾ nach Reinigung

7.2.2 Chemische DNA-Synthese und Reinigung

Die automatische DNA-Synthese erfolgte genau wie die RNA-Synthese nach dem Phosphoramiditverfahren an fester Phase. Hierbei kamen 5'-*O*-Di-methoxytrityl-geschützte β -Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidite (*N*⁶-phenoxyacetyl-dA, *N*²-4-*i*-propyl-phenoxyacetyl-dG, *N*⁴-*i*-butyryl-dC, dT) und Polystyrenträger (1000 Å) mit Succinat-gekoppeltem, 3'-terminalem Nukleosid von Amersham Pharmacia Biotech zum Einsatz. Die Synthesen wurden im 0.2 µmol Maßstab und unter den Bedingungen durchgeführt, die vom Hersteller (Pharmacia) empfohlen sind. Ein Standardzyklus unter Tetrazolaktivierung war durch 2 min Kupplungszeit, 200fachem Überschuss an Tetrazol und 25fachem Überschuss an zu kuppelndem Phosphoramidit über die feste Phase gekennzeichnet. Für Synthesen mit dem kostengünstigeren (weil selbst hergestellten) BMT wurde anstelle der 0.5 M Tetrazollösung eine 0.25 M Lösung von BMT in Acetonitril verwendet, während alle anderen Parameter unverändert blieben. Alle Synthesen wurden „trityl on“ durchgeführt (die 5'-DMTr-Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Nukleotids wurde nicht abgespalten).

Nach der Synthese erfolgte die Abspaltung der Basenschutzgruppen, der β -Cyanoethylschutzgruppen und des gesamten Oligonukleotids vom Träger durch Einwirkung von ammoniakgesättigtem Methanol bei Raumtemperatur für 15 h. Die ammoniakalische Lösung wurde zur Trockne lyophilisiert, der Rückstand in 100 bis 500 µl Wasser aufgenommen und durch HPLC an einer RP-Kieselgelsäule (Nucleosil 120-5 C18, 120 x 16 mm, Knauer) gereinigt, wobei folgende Puffer und Gradienten verwendet wurden:

- F:** Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 5 % Acetonitril
 Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 30 % Acetonitril
 Flussrate: 1 ml/min
 Gradient: linear, 0 % B über 2 min, 0-40 % B über 5 min, 40-100 % B über 30 min
- G:** Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 5 % Acetonitril
 Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 30 % Acetonitril
 Flussrate: 1 ml/min
 Gradient: linear, 0 % B über 2 min, 0-40 % B über 5 min, 40-70 % B über 30 min, 70-100 % B über 5 min

- H:** Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 5 % Acetonitril
 Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 30 % Acetonitril
 Flussrate: 1 ml/min
 Gradient: linear, 0 % B über 2 min, 0-40 % B über 5 min, 40-70 % B über 40 min,
 70-100 % B über 5 min

Die produkthaltigen Fraktionen wurden zur Trockne lyophilisiert und der Rückstand zur Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe für 40 min bei Raumtemperatur mit 200 µl 80%iger Essigsäure versetzt. Die essigsäure Lösung wurde dann erneut lyophilisiert und zweimal mit je 100 µl Wasser ko-evaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl Wasser aufgenommen und die Lösung zweimal mit je 100 µl Ethylacetat extrahiert. Das Oligonukleotid wurde dann aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt (s.7.2.4.3).

Abweichend von der beschriebenen Aufarbeitung der DNA-Syntheseprodukte wurde die 48-mer DNA dS-TW3-3'Φ, die genau wie ein RNA-Substrat mit einer 3-Fluoreszeinmarkierung versehen wurde (s. 7.2.1.3), durch denaturierende PAGE gereinigt (s. 7.2.4.1). In Tab. 11 sind alle verwendeten, chemisch synthetisierten DNA-Stränge aufgelistet, einschließlich der bei BioTeZ GmbH (Berlin-Buch) gekauften, die bereits HPLC-gereinigt und entsalzt geliefert wurden.

7.2.3 Enzymatische RNA-Synthese

7.2.3.1 Auffüllreaktion zum DNA-Doppelstrang

Zur Synthese der DNA-Doppelstränge wurden zwei Primer, die sich am 3'-Ende um 9 bis 36 Basenpaare komplementär überlappen, im Reaktionspuffer (s. unten) für 5 min auf 90 °C erhitzt, dann langsam auf 37 °C abgekühlt und zur Hybridisierung weitere 30 min dabei belassen. Anschließend wurden die vier Desoxynukleotidtriphosphate und DNA-Polymerase zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert, so dass sich für einen typischen Ansatz folgende Konzentrationen ergaben:

| | |
|-----------------------------------|--|
| Reaktionsvolumen: | 500 µl |
| DNA-Primer: | je 2 µM |
| dNTPs: | je 500 µM |
| Puffer: | 50 mM Tris·HCl, pH 8.5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT |
| DNA-Polymerase (Klenow-Fragment): | 0.04 AE /µl |

Für einen Standardansatz wurde dabei eine DNA-Polymerase ohne Exonukleaseaktivität verwendet („Klenow Fragment, exo⁻“), nur im Falle der Auffüllreaktion für HP-TW5 (s. Kap. 5.3.2), bei dem zusätzlich zu den beiden Primern zwei 15-mer Antisense-Oligonukleotide zugesetzt wurden, kam ein Klenow-Fragment mit Exonukleaseaktivität zum Einsatz.

Nach Ende der Reaktion wurde die Lösung einer Ethanol-fällung unterzogen (s. 7.2.4.3) und die doppelsträngige DNA durch native Gelelektrophorese isoliert (s. 7.2.4.2). Die Gel-Elutionslösungen wurden zur Abtrennung letzter Proteinspuren einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, und abschließend erfolgte eine Ethanol-fällung (s. 7.2.4.3).

7.2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Elutionslösung wurde dreimal mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol extrahiert (TE: 0.01 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Die wässrige Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nacheinander mit gleichem Volumen an Chloroform/*iso*-Amylalkohol (24:1) und Diethylether gewaschen.

7.2.3.3 *in vitro* Transkription

Die doppelsträngige DNA-Matrize wurde im Transkriptionspuffer (s. unten) zusammen mit den 4 Nukleosidtriphosphaten und T7-RNA-Polymerase für 2 h bei 37 °C inkubiert, so dass sich für einen typischen Transkriptionsansatz folgende Konzentrationen ergaben:

| | |
|--------------------|--|
| Reaktionsvolumen: | 50 µl |
| DNA-Matrize: | 1 µM |
| NTPs: | je 500 µM |
| Puffer: | 40 mM Tris-HCl, pH 7.9, 6 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 2 mM Spermidin |
| T7-RNA-Polymerase: | 4 AE/µl |

Nach Reaktionsende wurden die Transkripte mit Ethanol gefällt (s. 7.2.4.3) und durch denaturierende Gelelektrophorese gereinigt (s. 7.2.4.1). Alle enzymatisch synthetisierten RNA-Stränge sind in Tab. 12 zusammengestellt, bei wiederholt durchgeführten Ansätzen wurden die besten Ausbeuten angegeben.

Tab. 11: Chemisch synthetisierte DNA-Stränge.

| Name | Länge | Sequenz (5'→3') | Reinigung ¹⁾ | Ausbeute ²⁾ |
|------------|-------|--|-------------------------|------------------------|
| P1-T7 | 45 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA AGA GAG AAG TGA ACC AGA GAA | F | 20 nmol |
| P2 | 36 | TAC CAG GTA ATA TAC CAC AAC GTG TGT TTC TCT GGT | F | 47 nmol |
| P2-TL | 37 | TAC CAG GTA ATA TAC CAC CGA AGT GTG TTT CTC TGG T | BioTeZ | - |
| P2-H4 | 42 | TAC CAG GTA ATA TAC CAC GCG AAC CGC GTG TGT TTC TCT GGT | BioTeZ | - |
| P2-TLH4 | 43 | TAC CAG GTA ATA TAC CAC GCG CGA ACG CGT GTG TTT CTC TGG T | BioTeZ | - |
| P2-TJoA | 49 | AGA CAG TCC AGA AAA CCA GGT AAT ATA CCA CAA CGT GTG TTT CTC TGG T | G | 32 nmol |
| P2-TJ0 | 50 | AGA CAG TCC AGA AAT ACC AGG TAA TAT ACC ACA ACG TGT GTT TCT CTG GT | G | 17 nmol |
| P2-TJ1 | 51 | AGA CAG TCC AGA AAG TAC CAG GTA ATA TAC CAC AAC GTG TGT TTC TCT GGT | G | 21 nmol |
| P2-TJ2 | 52 | AGA CAG TCC AGA AAG GTA CCA GGT AAT ATA CCA CAA CGT GTG TTT CTC TGG T | G | 63 nmol |
| P-TJ3 | 53 | AGA CAG TCC AGA AAG GGT ACC AGG TAA TAT ACC ACA ACG TGT GTT TCT CTG GT | G | 14 nmol |
| P2-TJ3-V | 66 | AGA CAG TCC AGA AAG GGT ACC AGG TAA TGT ACC TGC GCC GAA GCG CAG TGT TTC TCT GGT TCA CTT | BioTeZ | - |
| P2-TJ4 | 54 | AGA CAG TCC AGA AAG GGG TAC CAG GTA ATA TAC CAC AAC GTG TGT TTC TCT GGT | G | 47 nmol |
| P2-TJ5 | 55 | AGA CAG TCC AGA AAG GGG GTA CCA GGT AAT ATA CCA CAA CGT GTG TTT CTC TGG T | G | 61 nmol |
| P1-SV2-T7 | 46 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT TTC TGA GAA GTC AAC CAG AGA A | BioTeZ | - |
| P1-SV4-T7 | 49 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GTC ACA CAA CAA GAA GGC AAC CAG AGA A | BioTeZ | - |
| P2-TJ-SV2 | 66 | TCT CTC TTT CTC CCG GGT ACC AGG TAA TGT ACC TGC GCC GAA GCG CAG TGT TTC TCT GGT TGA CTT | BioTeZ | - |
| P2-TJ3-SV2 | 66 | TCT CTC TTT CTC CCG GGT ACC AGG TAA TGT ACC ACG CGC GAA CGC GTG TGT TTC TCT GGT TGA CTT | BioTeZ | - |

| | | | | |
|---------------|----|--|--------|---------|
| P1-TW2-T7 | 79 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA AGA GAG AAG TGG ACC AGA GAA ACA CAC GTT GTG GTA TAT TAC CTG GTA CCC GGG A | H | 8 nmol |
| P2-TW2 | 72 | TAC CAG GTA ATA TAC CAC AAC GTG TGT TTC TCT GGT AGA CTT CTC AGA AAT CTC CCG GGT ACC AGG TAA TAT | G | 12 nmol |
| AS15-3'Biotin | 15 | CTT CTC TCT TTC GGC -Biotin | BioTeZ | - |
| P1-TW5-T7 | 97 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA AGA GAG AAG TGA ACC AGA GAA ACA CTG CGC TTC GGC GCA GGT ATA TTA CCT GGT ACC CGG GAG ATT TCT GAG A | BioTeZ | - |
| P2-TW5 | 97 | GCG CTG CAA GGG GTA CCA GGT AAT GTA CCA CGC GCG AAC GCG TGT GTT TCT CTG GTT GAC TTC TCA GAA ATC TCC CGG GTA CCA GGT AAT ATA CCT G | BioTeZ | - |
| P1-TW5-anti | 15 | TTC TCT GGT TCA CTT | BioTeZ | - |
| P2-TW5-anti | 15 | TAC ATT ACC TGG TAC | BioTeZ | - |
| dS-TW3-3'Φ | 48 | GCG CGT CAA GTG ACA GTC CAG AAA TCT CCC TCA CAG TCC TCT TTC GGC -Φ | Gel | 13 nmol |

¹⁾ F-H: HPLC im entsprechendem Puffer- und Gradientensystem, BioTeZ: gelieferte und HPLC-gereinigte DNAs, Gel: Gelelektrophoretische Reinigung; ²⁾ nach Reinigung

Tab. 12: Enzymatisch synthetisierte RNA-Stränge.

| Name | Länge | Sequenz (5'→3') | Ausbeute ¹⁾ |
|------------|-------|--|------------------------|
| HP-WTL | 55 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU A | 207 pmol |
| HP-WTTL | 56 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CUU CGG UGG UAC AUU ACC UGG UA | 371 pmol |
| HP-WTLH4 | 61 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGC GGU UCG CGU GGU ACA UUA CCU GGU A | 147 pmol |
| HP-WTTLH4 | 62 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGC GUU CGC GCG UGG UAC AUU ACC UGG UA | 470 pmol |
| HP-SV2TLH4 | 62 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGC GUU CGC GCG UGG UAC AUU ACC UGG UA | 74 pmol |

| | | | |
|-------------------------|-----|---|----------|
| HP-SV4 | 59 | GGG AGU CAC ACA ACA AGA AGG CAA CCA GAG AAA CAC ACG UUG UGG UAU AUU ACC UGG UA | 122 pmol |
| HP-TJoA | 68 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU UUU CUG GAC UGU CU | 142 pmol |
| HP-TJ ₀ | 69 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU AUU UCU GGA CUG UCU | 128 pmol |
| HP-TJ ₁ | 70 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU ACU UUC UGG ACU GUC U | 148 pmol |
| HP-TJ ₂ | 71 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU ACC UUU CUG GAC UGU CU | 258 pmol |
| HP-TJ ₃ | 72 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU ACC CUU UCU GGA CUG UCU | 179 pmol |
| HP-TJ ₄ | 73 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU ACC CCU UUC UGG ACU GUC U | 135 pmol |
| HP-TJ ₅ | 74 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACA CGU UGU GGU ACA UUA CCU GGU ACC CCC UUU CUG GAC UGU CU | 127 pmol |
| HP-TJ ₃ -V | 79 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACU GCG CUU CGG CGC AGG UAC AUU ACC UGG UAC CCU UUC UGG ACU GUC U | 76 pmol |
| HP-TJ ₃ -SV2 | 80 | GGG AGA UUU CUG AGA AGU CAA CCA GAG AAA CAC ACG CGU UCG CGC GUG GUA CAU UAC CUG GUA CCC GGG AGA AAG AGA GA | 265 pmol |
| HP-TW5 | 141 | GGG AGA AAG AGA GAA GUG AAC CAG AGA AAC ACU GCG CUU CGG CGC AGG UAU AUU ACC UGG UAC CCG GGA GAU UUC UGA GAA GUC AAC CAG AGA AAC ACA CGC GUU CGC GCG UGG UAC AUU ACC UGG UAC CCC UUG CAG CGC | 400 pmol |

¹⁾ nach Reinigung durch PAGE

7.2.4 Weitere Methoden zur Reinigung und Isolierung von Oligonukleotiden

7.2.4.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Es wurden 15-20%ige Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) Gellösungen mit 7M Harnstoff verwendet, aus denen unter Zusatz von Ammoniumpersulfat und TEMED 1.5 mm dicke Gele hergestellt wurden. Die Proben wurden in Formamidpuffer (98 % Formamid in 10 mM wässriger EDTA-Lösung v/v, 0.05 % Bromphenolblau oder 0.05 % Xylencyanol) bei einer Beladungsdichte zwischen 1 und 5 O.D.₂₅₄ pro cm aufgetragen (für die Reaktionsprodukte eines Transkriptionsansatzes war eine 0.5 cm Geltasche ausreichend). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 20 V/cm, die Produktbanden wurden anschließend im UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Die RNA wurde durch 3fach wiederholte Zugabe von ca. 10 µl Elutionspuffer (0.5 M NaOAc, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) pro mm³ Gel über einen Zeitraum von mindestens 6 h aus den Gelstücken eluiert und durch Ethanolfällung aus den vereinigten Elutionslösungen gefällt (s.7.2.4.3).

7.2.4.2 Native Gelelektrophorese

Für die native Gelelektrophorese wurden 10-15%ige Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) Gellösungen eingesetzt, aus denen unter Zusatz von Ammoniumpersulfat und TEMED 1.5 mm dicke Gele hergestellt wurden. Die Proben wurden in je 10 µl Wasser und Auftragungspuffer (50 % Glycerin, 0.05 % Bromphenolblau oder 0.05 % Xylencyanol) gelöst und in eine Geltasche (0.5 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 20 V/cm, die Produktbanden wurden anschließend im UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Die DNA wurde durch 3fach wiederholte Zugabe von ca. 10 µl Elutionspuffer (0.5 M NaOAc, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) pro mm³ Gel über einen Zeitraum von mindestens 6 h aus den Gelstücken eluiert, einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und abschließend mit Ethanol gefällt (s.7.2.4.3).

7.2.4.3 Ethanolfällung

Zur wässrigen Lösung des Oligonukleotids wurden 1/10 des Volumens 3 M NaOAc-Lösung (pH 5.2), 1/5 des Volumens 0.05 M MgCl_2 -Lösung und das 2.5fache Volumen Ethanol gegeben, die Lösung gut durchmischt und mindestens 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen (i.A. über Nacht). Anschließend wurde 30 min bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert, das Pellet vorsichtig mit kaltem Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gewaschen und dann im Vakuum getrocknet.

7.2.4.4 Butanolfällung

Zur wässrigen Lösung des Oligonukleotids wurde das 20fache Volumen n-Butanol gegeben, die Lösung gut durchmischt und über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen. Anschließend wurde 15 min bei 6000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert, das Pellet mit wenig Butanol gewaschen und dann im Vakuum getrocknet.

7.2.4.5 RNA/DNA-Fällung als Lithiumsalz

Die wässrige Lösung wurde bis zu 4 M Li-Salz konzentriert und dann mit dem fünffachen Volumen Ethanol/Aceton (1:1) versetzt. Die Lösung wurde gut durchmischt und dann mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen (i.A. über Nacht). Anschließend wurde 1 h bei 5000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert, das Pellet mit kaltem Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gewaschen und dann im Vakuum getrocknet.

7.2.4.6 Dialyse

Für die Dialyse wurde der Dialyseschlauch (Visking, Medicell International) zuerst folgendermaßen vorbereitet: Ein ca. 10 cm langes Schlauchstück wurde 10 min in 1 l einer siedenden wässrigen Lösung (2 % NaHCO_4 , 1 mM EDTA) behandelt, anschließend eingehend mit sterilem Wasser gespült und in sterilem Wasser erneut für 10 min auf Siedetemperatur erhitzt. Der so vorbereitete Dialyseschlauch wurde bis zu seiner Verwendung unter sterilem Wasser bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die salzhaltige Oligonukleotidlösung wurde in den Dialyseschlauch gegeben und zunächst für mindestens 2 h gegen destilliertes Wasser (5 l, leichtes Rühren) dialysiert. Über einen Zeitraum von mindestens 8 h wurde das Wasser dreimal gewechselt. Anschließend wurde die wässrige Lösung des Oligonukleotids aus dem Dialyseschlauch entnommen und zur Trockne lyophilisiert..

7.2.4.7 Gelfiltration / Gelausschlusschromatografie

Für die Entsalzung der Oligonukleotide wurden entweder originale NAP 10-Säulen (Sephadex G25, 1 ml Totvolumen, Pharmacia) oder mit gleichem Material wiedergefüllte Säulen verwendet. Nach Equilibrierung mit mindestens 10 ml Wasser wurde 1ml der salzhaltigen Oligonukleotid Lösung auf die Säule gegeben und schrittweise mit 1 ml Wasser eluiert. Die oligonukleotidhaltigen Fraktionen wurden durch UV-spektroskopische Messung identifiziert und im Vakuum zur Trockne eingengt.

7.2.4.8 Reinigung von HP-TW3

Für die Reinigung des chemisch synthetisierten 141-mers HP-TW3 wurde ein Teil der Syntheserohprodukte einer Gelfiltration über eine NAP-Säule (7.2.4.7) unterzogen. Im Ergebnis wurde (unter anderem) eine Fraktion mit einer optischen Dichte von 92.4 O.D.₂₆₀/ml erhalten (das entspräche einer rund 100 µM Lösung eines reinen 141-mers), mit der folgende Reinigungsmethoden (erfolglos) durchgeführt wurden:

- denaturierende Gelelektrophorese (s. 7.2.4.1) bei 80 °C, wobei die Proben in einem gleichen Volumen Formamid für 5 min auf 90 °C erhitzt und anschließend sofort auf 10 oder 15%ige Polyacrylamidgele aufgetragen wurden;
- denaturierende Gelelektrophorese (wie 7.2.4.1) in zweiphasigen 10%igen Polyacrylamidgelen, deren oberes (die Geltaschen tragendes) Viertel nicht aus der Standardgellösung in Wasser, sondern aus einer 10%igen Lösung von Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) in Formamid hergestellt wurde;

- PAGE nach Denaturierung der RNA mit Glyoxal und DMSO (SAMBROOK et al. 1989): Dazu wurden 10 µl der HP-TW3-Lösung mit 6 µl 40% Glyoxal⁴, 25 µl DMSO, 5 µl 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7 und 4 µl Wasser für 1 h auf 50 °C erhitzt und anschließend eisgekühlt. Eine zweiter, identischer Reaktionsansatz wurde abschließend einer Ethanol-fällung unterzogen (7.2.4.3). Beide Proben wurden mittels Gelelektrophorese in denaturierenden 10%igen Polyacrylamidgelen analysiert (s. 7.2.4.1, die verwendeten Gellösungen und der TBE-Puffer waren auf pH 7 eingestellt).
- native Gelelektrophorese im Komplex mit einem 48-mer DNA-Substrat: Durch chemische Festphasensynthese wurde ein 48-mer DNA-Strang dS-TW3-3'Φ5'Φ synthetisiert (s. Tab. 11, S. 102), der die gleiche Sequenz wie das RNA-Substrat S-TW3-3'Φ5'Φ aufweist und von HP-TW3 vollständig gebunden werden sollte, jedoch nicht gespalten werden kann. 5 µl der HP-TW3-Lösung wurden mit 5 µl einer 20 µM Lösung des DNA-Substrates dS-TW3-3'Φ5'Φ und 8 µl TrisHCl pH 7.5 für 5 min auf 90 °C erhitzt und dann über einen Zeitraum von 30 min auf Raumtemperatur langsam abgekühlt. Dann wurden 2 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung zugesetzt und nach weiteren 15 min wurde das Gemisch auf Eis gestellt. Die Analyse der Mischung erfolgte über native Gelelektrophorese (7.2.4.2) in 10 %igen Polyacrylamidgelen.

7.2.5 Analyse der Ribozymreaktionen am A.L.F.-Sequenzierautomaten

Für die Analytik des zeitlichen Verlaufs der Ribozymreaktionen am A.L.F.-Sequenzierautomaten wurden 15 %ige denaturierende Polyacrylamidgele (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 7 M Harnstoff) mit 305 mm Höhe, 280 mm Breite und 0.5 mm Stärke in TBE-Puffer („0.6x“, d.h. 60 mM Tris·HCl, 51 mM Borsäure, 0.6 mM EDTA) verwendet. Der obere Bereich der Thermoplatte, in dem die Geltaschen liegen, wurde vor dem Gießen des Gels mit 200 µl Bindsilanlösung (0.75 % γ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan in Ethanol / 10 % Essigsäure 3:1) behandelt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 60 mg in 500 µl Wasser und 50 µl TEMED und dauerte ca. 1h. Die Elektrophorese verlief bei einer Spannung von 1500-1600 V (22 W als limitierende Größe

⁴ Die kommerziell erhältliche 40%ige Glyoxallösung in Wasser wurde vor Verwendung vorschriftsmäßig durch Waschen über Dowex Ionenaustauscher 1x4 (OH⁻) von Oxidationsprodukten befreit.

und 58 mA / 2000 V als Maximalwerte), einer Laserleistung von 4 mW und 25 °C Temperaturvorwahl. Die Auswertung der Rohdaten und die Peakintegration wurde mit der zugehörigen Software Fragment Manager V 1.2 (Pharmacia) vorgenommen.

7.2.6 Spaltreaktionen

I) Spaltreaktionen für die *multiple turnover* Kinetik:

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden sechs Reaktionen bei verschiedenen Ribozym- und Substratkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurden 1.5-5 µl 100 nM RibozymLösung mit 20 µl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 5-17 µl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 10 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1.5-10 µl einer 2 µM Substratlösung, so dass sich in 50 µl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl₂

3-10 nM Ribozym

30-200 nM Substrat

In geeigneten Zeitabständen, die der Reaktionsgeschwindigkeit des Ribozyms angepasst wurden (typisch waren Abstände von 2 bis 5 min), wurden der Reaktion Aliquots von 2 µl entnommen und sofort in 4 µl Stopmix (50 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 0.5 % Dextranblau) gegeben. Die Zeitproben wurden auf Eis oder bei -20 °C gelagert, bis der zeitliche Verlauf der Reaktionen durch Gelelektrophorese am A.L.F.-Sequenzierautomaten analysiert wurde (s. 7.2.5). Durch Regression der Datenpunkte in der linearen Anfangsphase der Reaktionen und Normalisierung der erhaltenen Geschwindigkeiten auf die eingesetzten Ribozymkonzentrationen wurden die k_{obs} -Werte der 6 Einzelreaktionen ermittelt. Durch Auftragung dieser Werte gegen die Substratkonzentration oder gegen $k_{\text{obs}}/[S]$ konnten dann gemäß Gleichung (1) S. 37 bzw. Gleichung (3) S. 37 die kinetischen Parameter k_{cat} und K_M bestimmt werden (s. Kap. 3.2).

II) Spaltreaktionen für die *single turnover* Kinetik:

In Analogie zur Bestimmung der kinetischen Parameter unter *multiple turnover* Bedingungen wurden sechs Reaktionen bei verschiedenen Ribozymkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurden 2.5-15 μl 1 μM Ribozymlösung mit 20 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 2.5-15 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 10 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 2.5 μl einer 200 nM Substratlösung, so dass sich in 50 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

50-300 nM Ribozym

10 nM Substrat

In geeigneten Zeitabständen, die der Reaktionsgeschwindigkeit des Ribozyms angepasst wurden (typisch waren Abstände von 10 bis 20 s), wurden der Reaktion Aliquots von 5 μl entnommen und sofort in 10 μl Stopmix (50 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 0.5 % Dextranblau) gegeben. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Reaktionen erfolgte wie unter I) beschrieben, die k_{obs} -Werte der 6 Einzelreaktionen ergaben sich hier durch Normalisierung auf die Substratkonzentration. Durch Auftragung dieser k_{obs} -Werte gegen $k_{\text{obs}}/[\text{E}]$ konnten dann gemäß Gleichung (6) S. 38 die kinetischen Parameter k_{react} und K_1 bestimmt werden (s. Kap. 3.2).

III) Standardspaltung unter *multiple turnover* Bedingungen:

2 μl einer 100 nM Ribozymlösung wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 4 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl einer 2 μM Substratlösung, so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

10 nM Ribozym

200 nM Substrat

Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion und die Ermittlung eines k_{obs} -Wertes erfolgten wie unter Reaktion I) beschrieben.

IV) Standardspaltung unter *single turnover* Bedingungen:

4 μl einer 1 μM RibozymLösung wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 2 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl einer 200 nM Substratlösung, so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

200 nM Ribozym

20 nM Substrat

Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion und die Ermittlung eines k_{obs} -Wertes erfolgten wie unter Reaktion II) beschrieben.

V) Spaltreaktionen unter Verwendung von Spermin:

2 μl einer 100 nM RibozymLösung wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und a) 4 μl , b) 3.2 μl oder c) 2 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden a) 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung, b) 4.8 μl einer 50 mM SperminLösung oder c) 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung und 2 μl einer 20 mM SperminLösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl einer 2 μM Substratlösung, so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 nM Ribozym

200 nM Substrat

a) 10 mM MgCl_2 ; b) 12 mM Spermin; c) 10 mM MgCl_2 und 2 mM Spermin

Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktionen und die Ermittlung der k_{obs} -Werte erfolgten wie unter Reaktion I) beschrieben.

VI) Spaltreaktionen zur Charakterisierung von HP-TW3:

2 μl einer 1 μM RibozymLösung wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und a) 5 μl Wasser bzw. b) 4 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von a) 1 μl einer 2 μM Substratlösung bzw. b) 2 μl einer 2 μM Substratlösung, so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

100 nM Ribozym

a) 100 nM Substrat; b) 200 nM Substrat

Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

VII) Vergleich der Spaltaktivität von HP-TJ₃-V und HP-TJ₃SV2:

Die Bestimmung der k_{obs} -Werte unter *multiple turnover* Bedingungen erfolgte wie bei Reaktion III. Für die Ermittlung der *single turnover* Daten wurden 2 μl einer 1 μM RibozymLösung zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 5 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1 μl einer 200 nM Substratlösung, so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

100 nM Ribozym

10 nM Substrat

Die Analyse des Zeitverlaufs der *single turnover* Reaktionen und die Ermittlung der k_{obs} -Werte erfolgten wie in Reaktion II) beschrieben.

VIII) Spaltreaktionen mit HP-TW5:

2 μl einer 1 μM RibozymLösung wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 0-7 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt.

Nach 15 min wurden a) 4 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung, b) 2 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung, c) 4 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung und 2 µl einer 20 mM Sperminlösung oder d) 4 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung und 4 µl einer 50 mM Sperminlösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1 µl einer 2 µM Substratlösung, so dass sich in 20 µl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

100 nM Ribozym

100 nM Substrat

a) 10 mM MgCl₂; b) 100 mM MgCl₂; c) 12 mM Spermin; d) 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin

Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

7.2.7 Synthese von RNA-Fragmenten mit 2',3'-Cyclophosphat

Die Synthese der für die Ligations- und Reparaturreaktionen benötigten RNAs mit 3'-terminalem 2',3'-Cyclophosphat erfolgte durch präparative Spaltung entsprechender Substrate durch die zugehörigen Ribozyme. Für die Herstellung des 19-mers 5'-SP-TJ-5'Φ wurde das 28-mer S-TJ-5'Φ mit HP-WTTL gespalten, die Spaltung des 29-mers S-FR-TW5 mit HP-WTTLH4 ergab das 20-mer Reparaturfragment FR-TW5. Dabei wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Reaktionsvolumen: 500 µl

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl₂

100 nM Ribozym

500 nM Substrat

25 µl einer 2 µM RibozymLösung wurde im Reaktionspuffer 1 min auf 90 °C erhitzt, auf 37 °C abgekühlt und nach 15 min mit 100 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung versetzt. Nach weiteren 15 min wurden 25 µl 10 µM Substratlösung zugegeben und die Reaktion für 1 d bei 37 °C gehalten. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung (s. 7.2.4.3), Reinigung der RNA durch denaturierende PAGE (s. 7.2.4.1) und abschließend wiederum eine Ethanolfällung (s. **Tab. 13**).

Tab. 13: RNA-Fragmente mit 2',3'-Cyclophosphat

| Name | Länge | Sequenz (5'→3') | durch Spaltung von | Reinigung | Ausbeute |
|--------------|-------|-----------------------------------|--------------------|-----------|-------------------------|
| 5'-SP-TJ-5'Φ | 19 | Φ- AGA CAG UCC AGA AAU CAC cpA | S-TJ-5'Φ | PAGE | 72 % (bzg. S-TJ-5'Φ) |
| FR-TW5 | 20 | GUC CAG AAA UCU CCC UCA C cpA | S-FR-TW5 | PAGE | 90 % (bzg. S-FR-TW5) |

7.2.8 Ligationsreaktionen

i) Re-Ligation durch die 3WJ-Ribozyme HP-TJ_n

2 µl einer 1 µM Ribozymlösung wurden zusammen mit 8 µl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 7 µl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 2 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1 µl einer 2 µM Substratlösung, so dass sich in 20 µl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

100 mM MgCl₂

100 nM Ribozym

100 nM Substrat

Die Reaktion wurde zunächst für 4 h bei 37 °C gehalten, anschließend auf 4 °C gebracht und die Re-Ligation der Spaltprodukte über einen Zeitraum von 60 min verfolgt. Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) S. 109 beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

ii) Abhängigkeit der Re-Ligation von der MgCl₂- und der Tris-Konzentration

Für die Untersuchung der Mg²⁺-Abhängigkeit der Re-Ligation wurden 2 µl einer 1 µM Ribozymlösung (HP-TJ₃) zusammen mit 8 µl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 0-9 µl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden b) 2 µl, c) 4 µl oder d) 8 µl einer 50 mM MgCl₂-Lösung bzw. e) 1 µl oder f) 2 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start

der Reaktion durch Zugabe von 1 μl einer 2 μM Substratlösung (S-TJ-5' Φ), so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

a) 0, b) 5, c) 10, d) 20, e) 50, f) 100 mM MgCl_2

100 nM Ribozym

100 nM Substrat

Für die Untersuchung der Tris-Abhängigkeit der Re-Ligation wurden 2 μl einer 1 μM RibozymLösung (HP-TJ₃) zusammen mit b) 2 μl , c) 4 μl oder d) 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 bzw. e) 2 μl 1 μM Tris·HCl pH 7.5 und 0-9 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 4 μl 50 mM MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1 μl einer 2 μM Substratlösung (S-TJ-5' Φ), so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

a) 0, b) 10, c) 20, d) 40, e) 100 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl_2

100 nM Ribozym

100 nM Substrat

Die Reaktionen beider Reihen wurden zunächst für 4 h bei 37 °C gehalten, anschließend auf 4 °C gebracht und die Re-Ligation der Spaltprodukte über einen Zeitraum von 60 min verfolgt. Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) S. 109 beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

iii) Temperaturabhängigkeit der Ligation durch HP-TJ₃

Für drei Reaktionsreihen a), b) und c) mit je 6 Einzelreaktionen wurden jeweils 2 μl einer 1 μM RibozymLösung zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und a) + c) 4 μl bzw. b) 6 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden a) + c) 4 μl einer 50 mM MgCl_2 -Lösung bzw. b) 2 μl einer 1 M MgCl_2 -Lösung zugesetzt, und nach 20 min erfolgte die Zugabe von 1 μl einer 2 μM Lösung des 19-mers 5'-SP-TJ-5' Φ . Die 6 Einzelreaktionen jeder Reaktionsreihe wurden auf sechs verschiedene Temperaturen zwischen 4 und 37 °C gebracht, bei denen dann die Ligationsreaktionen durchgeführt wurden. Nach weiteren 10 min erfolgte der Start der Reaktionen durch Zugabe von 1 μl einer 2 μM Lösung des a) +

b) 9-mers 3'-SP-WT bzw. c) des 14-mers 3'-SP-WT+5, so dass sich in 20 μ l Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

a) und c) 10 mM $MgCl_2$, b) 100 mM $MgCl_2$

100 nM Ribozym HP-TJ₃

100 nM Substrate: 5'-SP-TJ-5' Φ und a) + b) 3'-SP-WT bzw. c) 3'-SP-WT+5

Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 60 min verfolgt. Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) S. 109 beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

iv) Versuche zur Bestimmung kinetischer Konstanten für die Ligation

Von mehreren Versuchen zur Ermittlung kinetischer Ligationskonstanten sollen hier exemplarisch zwei Reaktionsreihen beschrieben werden, die bei 25 °C durchgeführt wurden (vgl. Tab. 5, S. 52). In Variante A) wurden HP-TJ₃ + 3'-SP-WT+5 als Ribozym und 5'-SP-TJ-5' Φ als Substrat verwendet, in Variante B) wurden HP-TJ₃ + 5'-SP-TJ-5' Φ als Ribozym und 3'-SP-WT+5 als Substrat eingesetzt (s. Abb. 30, S. 51). Je Variante wurden 6 Reaktionen bei verschiedenen Ribozymkonzentrationen unter *single turnover* Bedingungen durchgeführt.

Variante A): 1.5-4 μ l einer 2 μ M Lösung von HP-TJ₃ wurden zusammen mit 16 μ l 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 6-11 μ l Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 25 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 8 μ l einer 50 mM $MgCl_2$ -Lösung zugesetzt und nach 20 min erfolgte die Zugabe von 1.5-4 μ l einer 5 μ M Lösung des 14-mers 3'-SP-WT+5 (5 Äquivalente bezogen auf HP-TJ₃). Nach weiteren 10 min erfolgte der Start der Reaktionen durch Zugabe von 2 μ l einer 200 nM Lösung des 19-mers 5'-SP-TJ-5' Φ , so dass sich in 40 μ l Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM $MgCl_2$

75-200 nM Ribozymkomplex [HP-TJ₃ + 5 Äquivalente 3'-SP-WT+5]

10 nM Substrat 5'-SP-TJ-5' Φ

Im Abstand von 10 s wurden Proben entnommen und wie in Reaktion II) S. 109 beschrieben analysiert.

Variante B): 2-5 μl einer 2 μM Lösung von HP-TJ₃ wurden zusammen mit 16 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 2-8 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 25 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 8 μl einer 50 mM MgCl₂-Lösung zugesetzt und nach 20 min erfolgte die Zugabe von 2-5 μl einer 2.2 μM Lösung des 19-mers 5'-SP-TJ-5' Φ (1.1 Äquivalente bezogen auf HP-TJ₃). Nach weiteren 10 min erfolgte der Start der Reaktionen durch Zugabe von 4 μl einer 200 nM Lösung des 14-mers 3'-SP-WT+5, so dass sich in 40 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

10 mM MgCl₂

100-250 nM Ribozymkomplex [HP-TJ₃ + 1.1 Äquivalente 5'-SP-TJ-5' Φ]

20 nM Substrat 3'-SP-WT+5

Im Abstand von 10 s wurden Proben entnommen und wie in Reaktion II) S. 109 beschrieben analysiert.

Bei beiden Varianten ergab die Auftragung der ermittelten k_{obs} -Werte gegen $k_{\text{obs}}/[\text{E}]$ keinen linearen Zusammenhang gemäß Gleichung (6), S.38.

v) Cross-Ligation (Fragmentaustausch) durch HP-TJ₃

3.6 μl einer 1 μM Lösung von HP-TJ₃ wurden zusammen mit 8 μl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 7 μl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden 2 μl einer 1 M MgCl₂-Lösung zugesetzt, und nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Spaltreaktion durch Zugabe von 2 μl einer 2 μM Lösung des 28-mers S-TJ-5' Φ , so dass sich in 20 μl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

40 mM Tris·HCl pH 7.5

100 mM MgCl₂

200 nM Ribozym HP-TJ₃

100 nM Substrat S-TJ-5' Φ

Die Reaktion wurde zunächst für 4 h bei 37 °C gehalten, und anschließend wurden 2 μl einer 2.2 μM Lösung von 3'-SP-WT-3' Φ zugegeben (Endkonzentration 200 nM; die Konzentrationen an Ribozym und an ursprünglich eingesetztem 28-mer verringern sich dadurch auf ca. 180 bzw. 90 nM). Die Reaktionslösung wurde auf 6 °C gebracht und die Ligation der Spaltfragmente über einen Zeitraum von 60 min

verfolgt. Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) S. 109 beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

7.2.9 RNA-Reparaturreaktionen

1) Reparaturreaktionen mit HP-TW5 unter Variation der Kofaktorkonzentrationen

4 µl einer 1 µM Lösung von HP-TW5 wurden zusammen mit 8 µl 100 mM Tris·HCl pH 7.5 und 0.8-2.8 µl Wasser für 1 min auf 90 °C erhitzt und dann auf 37 °C abgekühlt. Nach 15 min wurden folgende Kofaktormengen zugegeben:

- a) 4 µl 50 mM MgCl₂,
- b) 2 µl 1 M MgCl₂,
- c) 4 µl 50 mM MgCl₂ und 0.8 µl 50 mM Spermin,
- d) 2 µl 100 mM MgCl₂ und 2 µl 100 mM Spermin,
- e) 2 µl 1 M MgCl₂ und 2 µl 100 mM Spermin.

Nach weiteren 15 min erfolgte der Start der Reaktionen durch Zugabe von 2 µl einer 2 µM Lösung des 45-mer Substrats S-TW5-3'Φ5'Φ. Nach 4 h bei 37 °C wurden 1.2 µl einer 9 µM Lösung des 20-mer Reparaturoligonukleotids FR-TW5 zugegeben, so dass sich in 20 µl Reaktionsvolumen folgende Endkonzentrationen ergaben:

- 40 mM Tris·HCl pH 7.5
- 200 nM Ribozym HP-TW5
- 200 nM Substrat S-TW5-3'Φ5'Φ
- 540 nM FR-TW5
- a) 10 mM MgCl₂
- b) 100 mM MgCl₂
- c) 10 mM MgCl₂ und 2 mM Spermin
- d) 10 mM MgCl₂ und 10 mM Spermin
- e) 100 mM MgCl₂ und 10 mM Spermin

Die Reaktion wurde noch 2 h bei 37 °C gehalten und dann für weitere 24 h bei Raumtemperatur belassen (ca. 22 °C). Die Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion erfolgte wie in Reaktion I) S. 109 beschrieben am A.L.F.-Sequenzierautomaten (s. 7.2.5).

2) Präparativer Reparaturansatz zur Isolierung des Reparaturprodukts

Um ausreichende Mengen an Reparaturprodukt für eine Sequenzierung zu erhalten, wurde die Reparaturreaktion 1c) fünffach wiederholt. Jede der 5 Reaktionen wurden nach den 24 h bei Raumtemperatur durch Zugabe von 40 µl Stopmix (50 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 0.5 % Dextranblau) beendet und anschließend wurden die vereinten Reaktionsmischungen auf die 40 Taschen eines A.L.F.-Sequenziergels verteilt. Der Elektrophoreseverlauf wurde online verfolgt und die Elektrophorese nach 280 min gestoppt, als das 49-mer Reparaturprodukt den Laserstrahl passierte. Das Gel wurde der Apparatur entnommen und auf Höhe der Photodetektoren wurde ein etwa 4 mm breiter Gelstreifen ausgeschnitten (zur Sicherheit war der Bereich etwas in Richtung Katode verschoben, um möglichst kein 45-mer Ausgangssubstrat einzuschließen), aus dem später die RNA isoliert, amplifiziert und sequenziert wurde (s. Kap. 6.3).

8 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Konzept für die gezielte Sequenzveränderung von RNA-Strängen verfolgt. In Erweiterung der *Antisense*-Strategie und der Strategie der ribozymvermittelten RNA-Spaltung, die bereits das Stadium der klinischen Testphase für die therapeutische Behandlung von Tumoren und Virusinfektionen erreicht haben, sollten zwei Hairpinribozyme zu einem Twinribozym vereinigt werden, das in der Lage ist, ein Fragment einer Ziel-RNA gegen ein anderes auszutauschen. Damit wäre nicht nur Inhibierung sondern sogar die Korrektur genetischer Information auf mRNA-Ebene realisierbar.

Die Umsetzung dieses Konzepts erforderte den Einsatz und die Optimierung von geeigneten Methoden zur Synthese der Ribozyme und Substrate. Das Hairpinribozym musste für die Verknüpfung zweier Einheiten in einem Twinribozym strukturell verändert und hinsichtlich Spalt- und Ligationseigenschaften untersucht werden. Schließlich waren optimierte Einzelmotive in einem Twinribozym zu vereinigen und damit der RNA-Sequenzaustausch experimentell zu erproben. Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Während die Ribozyme durch Transkription von DNA-Doppelsträngen mit T7-RNA-Polymerase zugänglich waren, wurden die zum Teil fluoreszeinmarkierten Substrate über chemische Festphasensynthese hergestellt. Bei der Synthese nach dem Standard-phosphoramiditverfahren unter Tetrazolaktivierung bedingen Kupplungsausbeuten von ca. 97 % je Schritt die Limitierung des Verfahrens auf Oligonukleotide mit einer Länge bis etwa 40 Nukleotide. Um auch für RNA-Stränge mit einer Länge > 40 nt, wie sie z.B. für Substrate der Twinribozyme benötigt wurden, akzeptable Ausbeuten zu gewährleisten, wurde 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol (BMT) als Aktivator bei der Synthese mit 2'-*O*-TBDMS-geschützten *O*- β -Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramiditen getestet und mit anderen kommerziellen Aktivatoren verglichen. Mit BMT wurden dabei die besten Ergebnisse erzielt, und bei gleich bleibend hohen Ausbeuten von > 99 % je Kupplungs-

schritt konnten die Standardsynthesebedingungen deutlich optimiert werden: Die Kupplungszeit ließ sich von 12 auf 3 Minuten und der Überschuss des Phosphoramidits über die Festphase von 15- auf 8-fach reduzieren. Damit wurde eine Methode entwickelt, Oligoribonukleotide nicht nur kostengünstiger und zeiteffizienter herzustellen, sondern es sind nun auch wesentlich längere RNA-Stränge mit dem Standardphosphoramiditverfahren mit guten bis sehr guten Ausbeuten zugänglich.

Die Synthese des Aktivators BMT wurde ausgehend von publizierten Synthesevorschriften optimiert. Durch Variation der Reaktionsbedingungen und des Aufarbeitungsprotokolls konnte eine Ausbeute von 72 % 5-(Benzylmercapto)-1*H*-tetrazol erreicht werden, dessen Reinheitsgrad den direkten Einsatz in der chemischen RNA- und DNA-Festphasensynthese erlaubte.

Für die Verknüpfung zweier katalytischer Motive wurde eine zusätzliche Helix in das Hairpinribozym integriert, so dass das Strukturmerkmal einer *three-way junction* entstand. Ein einzelsträngiger Linker aus 1...5 Cytidinresten sollte die notwendige Flexibilität am Knickpunkt zwischen den beiden katalytischen Domänen gewährleisten, die für die Faltung des Ribozyms in die Aktivkonformation notwendig ist. Die entstehenden 3WJ-Ribozyme HP-TJ_n unterschieden sich nur minimal in ihrer Spaltaktivität unter *multiple* und *single turnover* Bedingungen. Die Variante HP-TJ₃ zeigte die besten Resultate und wurde als Grundlage für die Verwendung in einem Twinribozym gewählt.

Die Untersuchungen der Ligationseigenschaften von HP-TJ₃ ergaben, dass strukturstabilisierende Faktoren, wie Temperaturerniedrigung von 37 °C auf 4 °C oder die Erhöhung der MgCl₂-Konzentration, die Ausbeute an Ligationsprodukt steigern. Die Verwendung eines 9- anstelle eines 14-mers als 3'-Eduktfragment bewirkte eine Verlängerung der Helix 1 von 6 auf 11 bp. Durch die damit verbundene Erhöhung der Stabilität des Ribozym-Edukt-Komplexes konnten selbst bei 37 °C Ligationsausbeuten von über 30 % erreicht werden. In einem Crossligationsexperiment zeigte sich die Eignung des Ribozyms für den Austausch eines unmarkierten gegen ein fluoreszenzmarkiertes 3'-Fragment.

Die beiden Einzelmotive eines Twinribozyms sollten die zugehörigen Substratsequenzen hochspezifisch spalten (und ligieren). Deshalb wurden Ribozyme mit veränderter

Substratbindungsdomäne untersucht, deren Sequenz möglichst unterschiedlich von der des Wildtyps ist. Unter diesen Ribozymen zeigte das mit der Sequenz SV2 eine Spaltaktivität im Bereich des Wildtyps und wurde als zweites Motiv ausgewählt.

Das zweisträngige Ribozym HP-WTL zeigte im Unterschied zum dreisträngigen Typ HP-WT eine Inhibierung der Spaltaktivität bei Zugabe von Spermin. Durch Verlängerung der Helix 4 von 3 auf 6 bp und Ersetzen des abschließenden Tri- durch einen Tetraloop konnte ein Hairpinribozym HP-WTTLH4 mit erhöhter Sperminakzeptanz generiert werden. Dies sollte sowohl in Bezug auf zukünftige *in vivo* Anwendungen als auch für die gezielte Steuerung der Aktivitäten in einem Twinribozym von Vorteil sein.

In Anwendung der Ergebnisse der Sequenz- und Strukturveränderungen wurden die Ribozyme HP-TJ₃-V und HP-TJ₃-SV2 synthetisiert, die vergleichbare Spaltaktivität aufwiesen und deren Sequenzen bereits hinsichtlich einer enzymatischen Synthese eines Twinribozyms optimiert waren.

Durch Einsatz von BMT als Aktivator gelang die chemische Festphasensynthese eines Twinribozyms HP-TW3 mit einer Länge von 141 nt. Der Beweis der Synthese vollständiger Produkte gelang dabei durch den Nachweis der Spaltaktivität *beider* Einzelmotive, die spezifisch nur die Substrate mit komplementärer Sequenz, nicht aber die des anderen Motivs spalteten. Da die Aufreinigung der Syntheserohprodukte jedoch nicht zur Isolierung von RNA-Strängen mit eindeutiger Länge und Identität führte, wurden mit diesem Ribozym keine Reparaturversuche unternommen.

Über die enzymatische Auffüllung zweier DNA-Primer und die anschließende Transkription der erhaltenen Doppelstränge konnte das Twinribozym HP-TW5 synthetisiert werden, das ebenfalls spezifische Spaltaktivität mit beiden Einzelmotiven aufwies. In Reparaturexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit diesem Ribozym ein 16-mer Fragment aus einer 45-mer Substrat-RNA herausgeschnitten und gegen ein 20-mer ausgetauscht wurde, wodurch nach zweifacher Ligation eine 49-mer Produkt-RNA in bis zu 30 % Ausbeute entstand. Die chemische Identität des Reparaturprodukts wurde durch Sequenzierung des 49-mers im Vergleich zur 45-mer Substrat-RNA eindeutig bewiesen.

Im Ergebnis dieser Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, zwei katalytische Motive unter Erhaltung der Aktivität und der Spezifität in einem Twinribozym zu vereinigen. Die erfolgreiche Reparatur einer Deletionsmutation in einer Modellreaktion ist

dabei nur ein erstes Beispiel für das Potential solcher Twinribozyme. Das prinzipielle Design erlaubt viele weitere Entwicklungen und Anwendungen, z.B. die Übertragung auf die Reparatur von Punkt- und Insertionsmutationen oder die Anpassung an verschiedene Zielsequenzen durch kombinatorische bzw. evolutive Gewinnung neuer Hairpinribozymvarianten. Gerade die enzymatische Synthese der Ribozyme ermöglicht den einfachen Transfer auf experimentelle Systeme *in vivo*.

Das Konzept der Twinribozym-vermittelten RNA-Reparatur konnte erfolgreich umgesetzt werden und eröffnet damit einen Zugang zu neuartigen gentherapeutischen Anwendungen.

Literaturverzeichnis

- BAN N, NISSEN P, HANSEN J, MOORE PB, STEITZ TA. **2000**. *Science* 289, 905-920.
- BARTEL DP, SZOSTAK JW. **1993**. *Science* 261, 1411-1418.
- BERNER S, MUHLEGGGER K, SELIGER H. **1989**. *Nucleic Acids Res* 17, 853-864.
- BERZAL-HERRANZ A, JOSEPH S, BURKE JM. **1992**. *Genes Dev* 6, 129-134.
- BERZAL-HERRANZ A, JOSEPH S, CHOWRIRA BM, BUTCHER SE, BURKE JM. **1993**. *EMBO* 12, 2567-2573.
- BEVILACQUA PC. **2003**. *Biochemistry* 42, 2259-2265.
- BRAUER G. **1975**. *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie in drei Bänden, Band I*, S. 457, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- BREAKER RR. **2002**. *Curr Opin Biotechnol* 13, 31-39.
- BUTCHER SE, BURKE JM. **1994**. *Biochemistry* 33, 992-999.
- BUZAYAN JM, HAMPEL A, BRUENING G. **1986**. *Nucleic Acids Res* 14, 9729-9743.
- CECH TR, ZAUG AJ, GRABOWSKI PJ. **1981**. *Cell* 27, 487-496.
- CHECK E. **2002**. *Nature* 420, 116-118.
- CHECK E. **2003**. *Nature* 421, 305.
- CHOWRIRA BM, BURKE JM. **1991**. *Biochemistry* 30, 8518-8522.
- CHOWRIRA BM, BERZAL-HERRANZ A, BURKE JM. **1993**. *Biochemistry* 32, 1088-1095.
- COUZIN J. **2002**. *Science* 298, 2296-2297.
- DAHL BH, NIELSEN J, DAHL O. **1987**. *Nucleic Acids Res* 15, 1729-1743.
- DEMKO ZP, SHARPLESS KB. **2001**. *J Org Chem* 66, 7945-7950.

- DOMBOS V. **2003**. *Diplomarbeit*. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- DONAHUE CP, YADAVA RS, NESBITT SM, FEDOR MJ. **2000**. *J Mol Biol* 295, 693-707.
- EARNSHAW DJ, MASQUIDA B, MÜLLER S, SIGURDSSON ST, ECKSTEIN F, WESTHOF E, GAIT MJ. **1997**. *J Mol Biol* 274, 197-212.
- EARNSHAW DJ, GAIT MJ. **1998**. *Nucleic Acids Res* 26, 5551-5561.
- EARNSHAW DJ, HAMM ML, PICCIRILLI JA, KARPEISKY A, BEIGELMAN L, ROSS BS, MANOHARAN M, GAIT MJ. **2000**. *Biochemistry* 39, 6410-6421.
- EKLAND EH, SZOSTAK JW, BARTEL DP. **1995**. *Science* 269, 364-370.
- ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T. **2001**. *Genes Dev* 15, 188-200.
- ESTEBAN JA, BANERJEE AR, BURKE JM. **1997**. *J Biol Chem* 272, 13629-13639.
- FEDOR MJ. **2000**. *J Mol Biol* 297, 269-291.
- FINNEGAN WG, HENRY RA, LOFQUIST R. **1958**. *J Am Chem Soc* 80, 3908-3911.
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. **1998**. *Nature* 391, 806-811.
- GASPARUTTO D, LIVACHE T, BAZIN H, DUPLAA AM, GUY A, KHORLIN A, MOLKO D, ROGET A, TEOULE R. **1992**. *Nucleic Acids Res* 20, 5159-5166.
- GILBERT W. **1986**. *Nature* 319, 618.
- GLÄSNER W, MERKL R, SCHMIDT S, CECH D, FRITZ HJ. **1992**. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373, 1223-1225.
- GUERRIER-TAKADA C, GARDINER K, MARSH T, PACE N, ALTMAN S. **1983**. *Cell* 35, 849-857.
- HAMPEL A, TRITZ R. **1989**. *Biochemistry* 28, 4929-4933.
- HAMPEL A, TRITZ R, HICKS M, CRUZ P. **1990**. *Nucleic Acids Res* 18, 299-304.

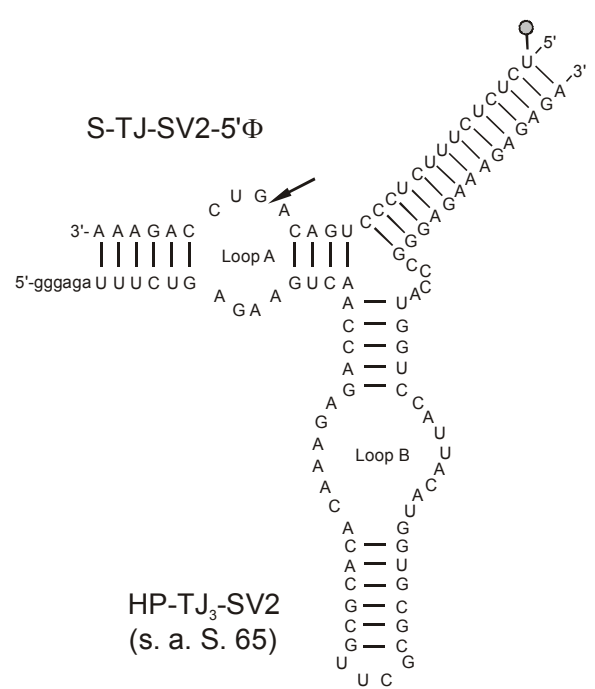
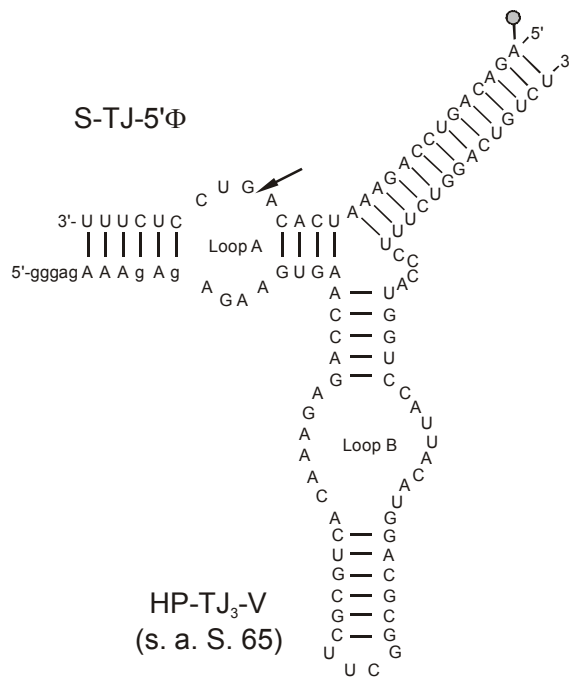
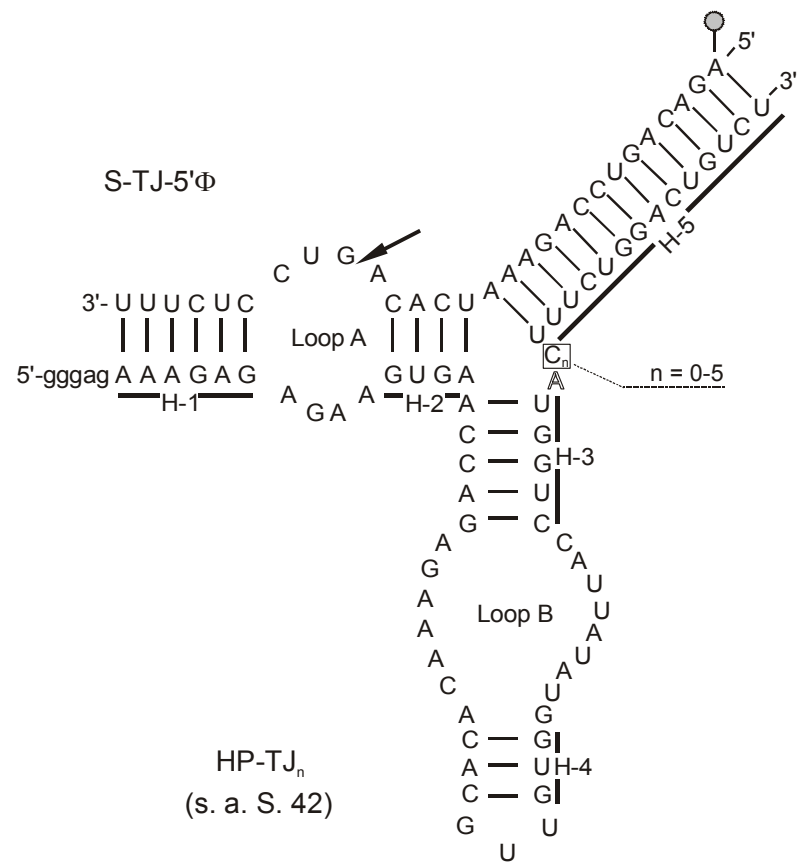
- HAMPEL A, COWAN JA. **1997**. *Chem Biol* 4, 513-517.
- HASELOFF J, GERLACH WL. **1988**. *Nature* 334, 585-591.
- HAUSCH F, JÄSCHKE A. **1997**. *Bioconjug Chem* 8, 885-890.
- HEGG LA, FEDOR MJ. **1995**. *Biochemistry* 34, 15813-15828.
- HERDER. **1995**. *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- JONES JT, LEE SW, SULLENGER BA. **1996**. *Nat Med* 2, 643-648.
- JOSEPH S, BERZAL-HERRANZ A, CHOWRIRA BM, BUTCHER SE, BURKE JM. **1993**. *Genes Dev* 7, 130-138.
- KARIMI R, EHRENBERG M. **1994**. *Eur J Biochem* 226, 355-360.
- KOMATSU Y, KANZAKI I, SHIRAI M, OHTSUKA E. **1997**. *Biochemistry* 36, 9935-9940.
- KRUGER K, GRABOWSKI PJ, ZAUG AJ, SANDS J, GOTTSCHLING DE, CECIL TR. **1982**. *Cell* 31, 147-157.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. **2001**. *Science* 294, 853-858.
- LAU NC, LIM LP, WEINSTEIN EG, BARTEL DP. **2001**. *Science* 294, 858-862.
- LEBRUSKA LL, KUZMINE, II, FEDOR MJ. **2002**. *Chem Biol* 9, 465-473.
- LEBLANC BW, JURISIC BS. **1998**. *Synth Commun* 28, 3591-3599.
- LEE RC, AMBROS V. **2001**. *Science* 294, 862-864.
- LEHNINGER. **2001**. *Biochemie*, S. 272, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- LETSINGER RL, FINNAN JL, HEAVNER GA, LUNSFORD WB. **1975**. *J Am Chem Soc* 97, 3278-3279.
- LIEBER E, ENKOJI T. **1961**. *J Org Chem* 26, 4472-4479.
- LOHSE PA, SZOSTAK JW. **1996**. *Nature* 381, 442-444.

- LORSCH JR, SZOSTAK JW. **1994**. *Nature* 371, 31-36.
- MICHAEL K, TOR Y. **1998**. *Chem Eur J* 4, 2091-2098.
- MILLIGAN JF, UHLENBECK OC. **1989**. *Methods Enzymol* 180, 51-62.
- MURCHIE AI, THOMSON JB, WALTER F, LILLEY DM. **1998**. *Mol Cell* 1, 873-881.
- MÜLLER S. **2002**. *Habilitationsschrift*. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- NAKANO S, CHADALAVADA DM, BEVILACQUA PC. **2000**. *Science* 287, 1493-1497.
- NESBITT S, HEGG LA, FEDOR MJ. **1997**. *Chem Biol* 4, 619-630.
- NESBITT SM, ERLACHER HA, FEDOR MJ. **1999**. *J Mol Biol* 286, 1009-1024.
- OGILVIE, KELVIN K., SADANA KL, THOMPSON EA, QUILLIAM MA, WESTMORE JB. **1974**. *Tetrahedron Letters* 15, 2861-2863.
- OJWANG JO, HAMPEL A, LOONEY DJ, WONG-STAAAL F, RAPPAPORT J. **1992**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10802-10806.
- PEGG AE, WECHTER R, PAKALA R, BERGERON RJ. **1989**. *J Biol Chem* 264, 11744-11749.
- PERROTTA AT, SHIH I, BEEN MD. **1999**. *Science* 286, 123-126.
- PINARD R, HECKMAN JE, BURKE JM. **1999**. *J Mol Biol* 287, 239-251.
- PINARD R, LAMBERT D, HECKMAN JE, ESTEBAN JA, GUNDLACH CWt, HAMPEL KJ, GLICK GD, WALTER NG, MAJOR F, BURKE JM. **2001**. *J Mol Biol* 307, 51-65.
- PINARD R, HAMPEL KJ, HECKMAN JE, LAMBERT D, CHAN PA, MAJOR F, BURKE JM. **2001**. *Embo J* 20, 6434-6442.
- PITSCH S, WEISS PA, JENNY L, STUTZ A, WU X. **2001**. *Helv Chim Acta* 84, 3773-3795.
- PRUDENT JR, UNO T, SCHULTZ PG. **1994**. *Science* 264, 1924-1927.
- PUTTARAJU M, JAMISON SF, MANSFIELD SG, GARCIA-BLANCO MA, MITCHELL LG. **1999**. *Nat Biotechnol* 17, 246-252.

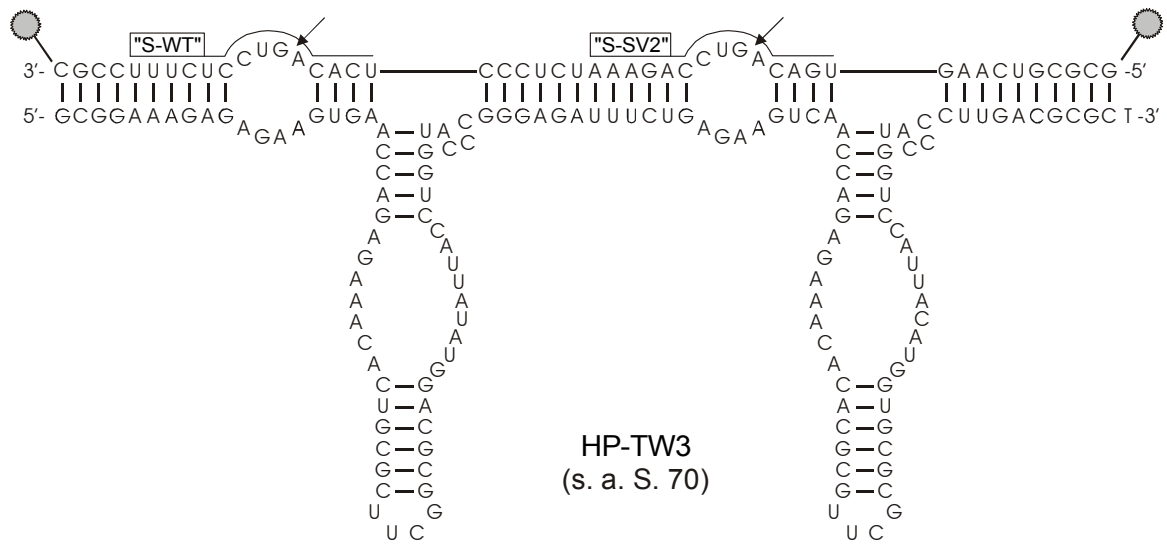
- RJORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK R, ZIELENSKI J, LOK S, PLAVSIK N, CHOU JL. **1989**. *Science* 245, 1066-1073.
- ROBINSON H, WANG AJH. **1996**. *Nucleic Acids Res* 24, 676-682.
- RUBINO L, TOUSIGNANT ME, STEGER G, KAPER JM. **1990**. *J Gen Virol* 71 (Pt 9), 1897-1903.
- RUPERT PB, FERRE-D'AMARE AR. **2001**. *Nature* 410, 780-786.
- RUPERT PB, MASSEY AP, SIGURDSSON ST, FERRE-D'AMARE AR. **2002**. *Science* 298, 1421-1424.
- SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. **1989**. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*, S. 7.40, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCARINGE SA, FRANCKLYN C, USMAN N. **1990**. *Nucleic Acids Res* 18, 5433-5441.
- SCARINGE SA. **2001**. *Methods* 23, 206-217.
- SCHMIDT S, BEIGELMAN L, KARPEISKY A, USMAN N, SORENSEN US, GAIT MJ. **1996**. *Nucleic Acids Res* 24, 573-581.
- SCHMIDT C, WELZ R, MÜLLER S. **2000**. *Nucleic Acids Res* 28, 886-894.
- SCHMIDT C. **2000**. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- SEKIGUCHI A, KOMATSU Y, KOIZUMI M, OHTSUKA E. **1991**. *Nucleic Acids Res* 19, 6833-6838.
- SENGLE G, EISENFUHR A, ARORA PS, NOWICK JS, FAMULOK M. **2001**. *Chem Biol* 8, 459-473.
- SIWKOWSKI A, SHIPPY R, HAMPEL A. **1997**. *Biochemistry* 36, 3930-3940.
- STÜHMEIER F, WELCH JB, MURCHIE AI, LILLEY DM, CLEGG RM. **1997**. *Biochemistry* 36, 13530-13538.
- SUDARSAN N, BARRICK JE, BREAKER RR. **2003**. *Rna* 9, 644-647.

- SULLENGER BA, CECH TR. **1994**. *Nature* 371, 619-622.
- SULLENGER BA, GILBOA E. **2002**. *Nature* 418, 252-258.
- TANNER NK. **1999**. *FEMS Microbiol Rev* 23, 257-275.
- TARASOW TM, TARASOW SL, EATON BE. **1997**. *Nature* 389, 54-57.
- USMAN N, BLATT LM. **2000**. *J Clin Invest* 106, 1197-1202.
- VALADKHAN S, MANLEY JL. **2001**. *Nature* 413, 701-707.
- VARGESE C, CARTER J, YEGGE J, KRIVJANSKY S, SETTLE A, KROPP E, PETERSON K, PIEKEN W. **1998**. *Nucleic Acids Res* 26, 1046-1050.
- WALLACE HM. **1989**. *Biochem Pharmacol* 38, 379-381.
- WALTER NG, BURKE JM. **1997**. *Rna* 3, 392-404.
- WALTER NG, HAMPEL KJ, BROWN KM, BURKE JM. **1998**. *Embo J* 17, 2378-2391.
- WELCH JB, WALTER F, LILLEY DM. **1995**. *J Mol Biol* 251, 507-519.
- WELZ R, SCHOLZ B, SCHMIDT C, MÜLLER S. **1999**. *Collection Symposium Series* 2, 331-334.
- WELZ R, SCHMIDT C, MÜLLER S. **2000**. *Mol Biol (Moscow)* 34, 934-939.
- WELZ R, SCHMIDT C, MÜLLER S. **2001**. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 648-654.
- WELZ R, MÜLLER S. **2002**. *Tetrahedron Letters* 43, 795-797.
- WELZ R, BOSSMANN K, KLUG C, SCHMIDT C, FRITZ HJ, MÜLLER S. **2003**. *Angew Chem* 115, 2526-2530. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 2424-2427.
- WIEGAND TW, JANSSEN RC, EATON BE. **1997**. *Chem Biol* 4, 675-683.
- WILSON C, SZOSTAK JW. **1995**. *Nature* 374, 777-782.

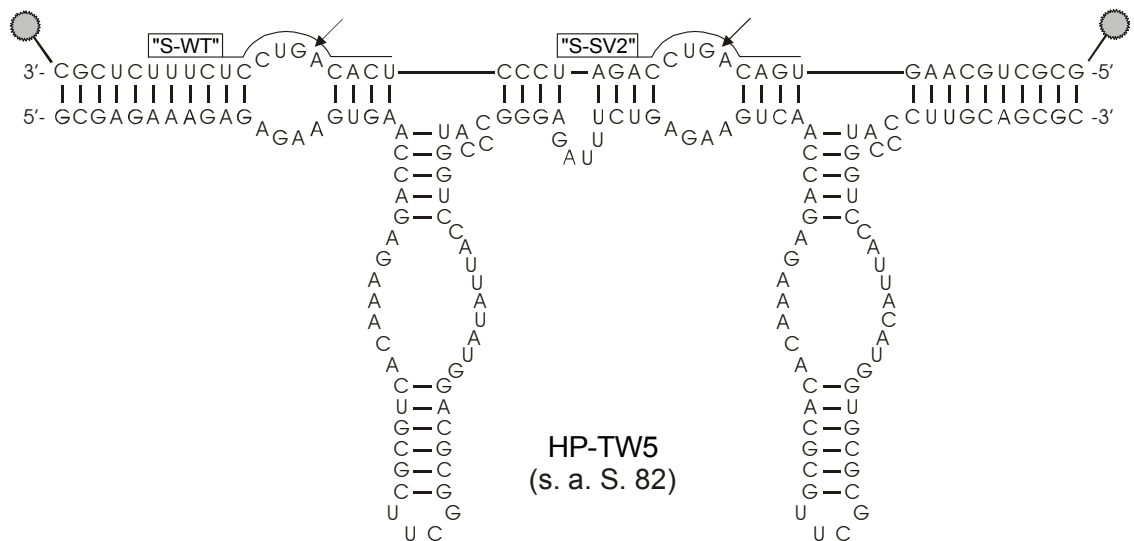
- WINCOTT F, DiRENZO A, SHAFFER C, GRIMM S, TRACZ D, WORKMAN C, SWEEDLER D, GONZALEZ C, SCARINGE S, USMAN N. **1995**. *Nucleic Acids Res* 23, 2677-2684.
- WINKLER WC, COHEN-CHALAMISH S, BREAKER RR. **2002**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15908-15913.
- WINKLER W, NAHVI A, BREAKER RR. **2002**. *Nature* 419, 952-956.
- YADAVA RS, CHOI AJ, LEBRUSKA LL, FEDOR MJ. **2001**. *J Mol Biol* 309, 893-902.
- ZHANG B, CECIL TR. **1997**. *Nature* 390, 96-100.
- ZHUANG X, KIM H, PEREIRA MJ, BABCOCK HP, WALTER NG, CHU S. **2002**. *Science* 296, 1473-1476.



S-TW3-3'Φ5'Φ



S-TW5-3'Φ5'Φ



Abbildungsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| Abb. 1: Mechanismus des Spleißens in cis von Gruppe I Introns und mRNA-Reparatur mittels in trans spleißender Gruppe I Ribozyme. | 5 |
| Abb. 2: Sekundärstrukturen der zwei katalytischen Motive der zirkulären Satelliten RNA des <i>Tobacco Ringspot Virus</i> (TRVS). | 7 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung der Replikation der Satelliten-RNA des <i>Tobacco Ringspot Virus</i> nach dem rolling circle Mechanismus. | 8 |
| Abb. 4: Primär- und Sekundärstruktur der 359 Nukleotide umfassenden, zirkulären TRSV RNA, sowie die minimale Form des Hairpinribozyms. | 9 |
| Abb. 5: Consensus-Sequenz und Sequenz einer häufig für Studien verwendeten, minimalen Form des Hairpinribozyms. | 10 |
| Abb. 6: Illustration der wichtigsten tertiären Kontakte zwischen den beiden Domänen des Hairpinribozyms. | 12 |
| Abb. 7: Mechanismus der vom Hairpinribozym vermittelten Spaltung u. Ligation. | 12 |
| Abb. 8: Mechanismus der katalytischen Reaktion: Molekulare Anordnung in der Umgebung der Spaltstelle, abgeleitet aus Kristallstrukturdaten. | 14 |
| Abb. 9: Verknüpfung zweier Hairpinribozyme zu einem Twinribozym und Prinzip der damit katalysierten RNA-Reparatur. | 16 |
| Abb. 10: Syntheszyklus des Phosphoramiditverfahrens. | 18 |
| Abb. 11: Phosphoramiditbausteine für die RNA-Synthese nach dem (Standard-) TBDMS-, dem TOM- und dem ACE-Verfahren. | 20 |
| Abb. 12: Synthese von 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazol durch [3+2]-Cycloaddition von Benzylthiocyanat und Aziden. | 22 |
| Abb. 13: HPLC-Chromatogramme der Rohprodukte einer 21mer-RNA-Synthese mit a) 1H-Tetrazol und b) 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazol als Aktivator. | 25 |
| Abb. 14: Aktivierung von Phosphoramiditen durch Tetrazole. | 26 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Abb. 15: | Analytische Chromatogramme eines RNA-Substrates vor und nach präparativer Aufreinigung durch HPLC an einer PL-SAX-Säule. | 27 |
| Abb. 16: | Schematische Illustration der enzymatischen RNA-Synthese. | 29 |
| Abb. 17: | Chromatogramme der Reinigung eines 37-mer DNA-Primers P2TL mit 5'-DMTr-Gruppe und nach DMTr-Abspaltung per HPLC. | 30 |
| Abb. 18: | Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Doppelstrangauffüllreaktionen in einem nativen Polyacrylamidgel. | 31 |
| Abb. 19: | Reinigung der von den Doppelsträngen in Abb. 16 transkribierten RNAs in einem 20%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. | 32 |
| Abb. 20: | Kommerzielle Fluoreszeinbausteine für die Markierung von Oligonukleotiden bei der chemischen Synthese nach dem Phosphoramiditverfahren. | 34 |
| Abb. 21: | Detektionsprinzip des A.L.F.-Sequenzierautomaten. | 35 |
| Abb. 22: | Rohdaten (b) und daraus gewonnene Zeitabhängigkeitskurve (c) der Reaktion des Hairpinribozyms HP-WTL mit einem 3'-fluoreszenzmarkiertem Substrat (a). | 36 |
| Abb. 23: | Beispiele für die (computergestützte) grafische Ermittlung kinetischer Parameter für das System HP-WTTLH4/S-WT-5' Φ . | 38 |
| Abb. 24: | Aus DNA-Strukturen abgeleitete Konformationen für Hairpinribozyme mit three-way junction und die aktive sowie die inaktive gestreckte Form des zweiarmigen Hairpinribozyms. | 40 |
| Abb. 25: | Sekundärstruktur der three-way junction Ribozyme HP-TJ _n im Komplex mit dem 3'-fluoreszenzmarkiertem 28-mer Substrat S-TJ-3' Φ . | 42 |
| Abb. 26: | Schematische Darstellung der Ribozym-Produkt-Komplexe verschiedener Formen des Hairpinribozyms. | 45 |
| Abb. 27: | Zeitverlauf der Spaltung und Re-Ligation von S-TJ-5' Φ durch HP-TJ ₃ und Vergleich des Re-Ligationvermögens der getesteten three-way junction Ribozyme. | 46 |
| Abb. 28: | Abhängigkeit der Re-Ligation in Abhängigkeit von der MgCl ₂ - und der Tris·HCl-Konzentration. | 47 |
| Abb. 29: | Strukturschema und grafische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Ligation von 5'-SP-TJ-5' Φ mit dem 9-mer 3'-SP-WT bzw. dem 14-mer 3'-SP-WT+5 durch HP-TJ ₃ . | 49 |

| | | |
|-----------------|---|----|
| Abb. 30: | Zwei Varianten zur Bestimmung der kinetischen Parameter für die Ligation durch HP-TJ ₃ unter single turnover Bedingungen. | 51 |
| Abb. 31: | Schematische Darstellung des Ablaufs und A.L.F.-Rohdaten des Cross-Ligationsexperiments. | 54 |
| Abb. 32: | Strukturen untersuchter Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne. | 56 |
| Abb. 33: | Vergleich der Strukturen und Spaltraten zweier four-way junction Hairpinribozyme (aus Murchie et al. 1998). | 57 |
| Abb. 34: | Sekundärstruktur und Vergleich der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten zweier Hairpinribozyme mit veränderter Substratbindungsdomäne. | 58 |
| Abb. 35: | Inhibierung der Spaltreaktion von HP-WTL durch Spermin bei konstanter MgCl ₂ -Konzentration (10 mM) unter Standardbedingungen. | 60 |
| Abb. 36: | Sekundärstrukturen von HP-WTL, HP-WTTL, HP-WTLH4 und HP-WTTLH4. | 61 |
| Abb. 37: | Spaltkurven für unterschiedliche Hairpinribozyme bei variierender Kofaktorkonzentration. | 62 |
| Abb. 38: | Die beiden optimierten Hairpinribozyme HP-WTTLH4 und HP-SV2TLH4, die unterschiedliche Substratsequenzen spalten. | 65 |
| Abb. 39: | Sekundärstrukturen der Twinribozyme HP-TW1 und HP-TW2. | 68 |
| Abb. 40: | Schematische Illustration der komplementären Bereiche der Primer und deren Lage in der Struktur des angestrebten Twinribozyms HP-TW2. | 69 |
| Abb. 41: | Sekundärstruktur des Twinribozyms HP-TW3, dessen Spaltstellen innerhalb des Substrates S-TW3-3'Φ5'Φ in Bereichen mit Wildtyp- und SV2-Sequenz liegen. | 70 |
| Abb. 42: | Reinigung von HP-TW3 nach der chemischen RNA-Synthese mittels einer biotinylierten DNA-Sonde und einer mit Streptavidin beladenen Agarosesäule. | 72 |
| Abb. 43: | Sekundärstrukturen der Einzelmotive HP-TJ ₃ -V und HP-TJ ₃ -SV2 und des Twinribozyms HP-TW3. | 73 |
| Abb. 44: | A.L.F.-Chromatogramme der Spaltexperimente der in Abb. 42 gezeigten Ribozyme mit den Substraten S-WT-5'Φ und S-SV2-5'Φ. | 74 |

- Abb. 45:** Schematische Darstellung der entstehenden Fragmente bei einfacher und doppelter Spaltung des Substrates S-WT3-3'Φ5'Φ und Rohdaten der Spaltung dieses Substrates durch die Abb. 42 gezeigten Ribozyme. 75
- Abb. 46:** Sekundärstrukturen der beiden Einzelmotive, die als Basis für die enzymatische Synthese des Twinribozyms HP-TW5 entworfen wurden. 77
- Abb. 47:** Konzept des Primerdesigns zur Vermeidung der Ausbildung des unerwünschten und zur Begünstigung des erwünschten Duplexes. 78
- Abb. 48:** Doppelspaltung von S-TW3-3'Φ5'Φ durch HP-TW5; Sekundärstruktur des Ribozym-Substrat-Komplexes und Rohdaten der Spaltreaktion. 80
- Abb. 49:** Modellreaktion für die Reparatur einer Deletionsmutation durch das Twinribozym HP-TW5. 82
- Abb. 50:** Spaltfragmente des Substrates S-TW5-3'Φ5'Φ und A.L.F.-Chromatogramme der Spaltreaktionen unter verschiedenen Bedingungen. 84
- Abb. 51:** Erzeugung des Reparaturfragments FR-TW5 durch Spaltung des 29-mers S-FR-TW5 mit HP-WTTLH4. 85
- Abb. 52:** Fragmentmuster und A.L.F.-Chromatogramme verschiedener Reparaturreaktion mit S-TW5-3'Φ5'Φ und FR-TW5. 86
- Abb. 53:** A.L.F.-Chromatogramm des präoperativen Reparaturansatzes und gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte des Reparaturproduktes. 89
- Abb. 54:** DNA-Sequenzanalyse für die aus dem Substrat (45-mer) und aus dem Produkt der Reparatur (49-mer) generierten PCR-Produkte. 89

Tabellenverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| Tab. 1: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der BMT-Synthesen im 0.02 mol Maßstab. | 23 |
| Tab. 2: Kinetische Daten der Substratspaltung durch Hairpinribozyme unter <i>multiple turnover</i> Bedingungen. | 39 |
| Tab. 3: Vergleich der kinetischen Daten der HP-TJ _n -Ribozyme unter <i>multiple turnover</i> Bedingungen. | 43 |
| Tab. 4: Vergleich der kinetischen Daten der HP-TJ _n -Ribozyme unter <i>single turnover</i> Bedingungen. | 44 |
| Tab. 5: Vergleich kinetischer Ligationsdaten aus verschiedenen Literaturquellen (Bedingungen: 22/25 °C; 40/50 mM Tris·HCl pH 7.5; 10/12 mM MgCl ₂). | 52 |
| Tab. 6: Ermittelte Reaktionsgeschwindigkeiten der Spaltung von S-WT-5'Φ durch verschiedene Hairpinribozyme bei verschiedenen Kofaktorkonzentrationen. | 63 |
| Tab. 7: Kinetische Parameter der optimierten Ribozyme für die Spaltung unter Michaelis-Menten-Bedingungen. | 65 |
| Tab. 8: Vergleich der Spaltaktivität der beiden in gezeigten Ribozyme (Bedingungen s. 7.2.6, S. 116, Reaktion VII). | 77 |
| Tab. 9: Vergleich der Ausbeute an Reparaturprodukt bei verschiedenen Kofaktorkonzentrationen. | 87 |
| Tab. 10: Chemisch synthetisierte RNA-Stränge. | 98 |
| Tab. 11: Chemisch synthetisierte DNA-Stränge. | 102 |
| Tab. 12: Enzymatisch synthetisierte RNA-Stränge. | 103 |
| Tab. 13: RNA-Fragmente mit 2',3'-Cyclophosphat. | 114 |

Danksagung

Das Thema der vorliegenden Arbeit wurde innerhalb eines DFG-Projektes in der Zeit von Januar 1999 bis Juli 2003 am Institut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin bearbeitet.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Sabine Müller, die mir viele wertvolle Anregungen gab und für wissenschaftliche Diskussionen stets zur Verfügung stand. Die enge fachliche Zusammenarbeit und die vielseitige Unterstützung bei der Präsentation der Forschungsergebnisse ermöglichten eine kreative und motivierende Arbeitsatmosphäre, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ferner danke ich:

- der EMP Biotech GmbH, besonders Herrn Dr. Uwe Möller und Herrn Dr. Derek Levison, sowie Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert für die zeitweise finanzielle Absicherung meiner Promotionsstelle,
- Frau Christina Schönherr für die Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei der chemischen Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden,
- Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz und Herrn Christian Klug für die Sequenzierung der Edukt- und Produkt-RNA-Stränge im Rahmen der Reparaturoperimente
- und allen Mitgliedern des Arbeitskreises, im besonderen Herrn Dr. Christian Schmidt, für die gute Zusammenarbeit und die angenehme und herzliche Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rüdiger Welz
Geburtsdatum: 08.06.1971
Geburtsort: Berlin

Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

| | |
|-------------------|---|
| 1978 – 1988 | 33. Polytechnische Oberschule Berlin „Werner Kube“, Berlin |
| 1988 - 1990 | Abitur, Erweiterte Oberschule „Käthe Kollwitz“, Berlin |
| 1990 - 1991 | Wehrersatzdienst |
| 1991 - 1996 | Studium der Chemie an der HU zu Berlin |
| 10/1995 - 06/1996 | Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dieter Cech zum Thema „Untersuchungen zur Spaltung von P=N-Bindungen in 3'-Phosphinimino-Nucleosiden mit Isothiocyanaten und Isocyanaten“ |
| 06/1996 | Abschlussprüfung zum Hauptstudium der Chemie |
| 07/1996 - 12/1998 | Wissenschaftliche Arbeit zur „Synthese und Immobilisierung von Kreatinin für die <i>in vitro</i> -Selektion“ bei Prof. Dr. C. Cech († 11/1997) und Prof. Dr. U. Koert an der HU Berlin |
| 01/1999 - heute | Anfertigung einer Doktorarbeit zum Thema „Entwicklung eines Twinribozyms für die RNA-Reparatur“ unter Betreuung von Prof. Dr. Sabine Müller am Institut für Organische und Bioorganische Chemie an der HU zu Berlin |

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erstellt zu haben.

Berlin, Juli 2003